

**SZABÓ ILDIKÓ**

**GnRH-III származékok szintézise a tumorelles hatás fokozása  
céljából**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezető:

Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó  
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Dr. Horváth István Tamás egyetemi tanár

Budapest, 2009

## Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás .....	4
Rövidítésjegyzék.....	5
Bevezetés.....	8
1 Irodalmi áttekintés .....	10
1.1 A gyógyszerek célzott sejtbe juttatása (targetálás) .....	10
1.2 A GnRH peptidek előfordulása és élettani hatása .....	15
1.3 A GnRH peptidek szerkezet-hatás összefüggése .....	18
1.4 Az emberben előforduló kétféle GnRH receptor (GnRH-IR és GnRH-IIR) .....	20
1.5 A GnRH receptorok szerepe a tumoros szövetek fiziológiájában .....	22
1.6 A GnRH-I receptor jelátviteli útvonalai.....	24
1.7 Antiproliferatív hatás kifejtése GnRH-II receptoron keresztül .....	25
1.8 A célzott sejtbejuttatás GnRH analógok alkalmazásával - történeti áttekintés .....	26
1.8.1 A GnRH analógok melfalánnal alkotott konjugátumai.....	27
1.8.2 A GnRH-I metallopeptid származékai .....	27
1.8.3 Citosztatikumot tartalmazó GnRH-I származékok.....	28
1.8.3.1 A GnRH-I AN-152 és AN-207 analógjai.....	30
1.8.4 N-terminális felől rövidített GnRH-I fragmens származékok.....	32
1.9 A GnRH-III peptid.....	33
1.10 A GnRH dimerek .....	35
2 A szilárdfázisú peptidszintézis elve és gyakorlati alkalmazása.....	36
3 Célkitűzések .....	38
4 Eredmények .....	42
4.1 A GnRH peptidek és hatóanyagot tartalmazó GnRH konjugátumok szintézis .....	42
4.1.1 Lineáris GnRH származékok szintézise .....	42
4.1.2 Elágazó láncú GnRH származékok szintézise.....	45
4.1.3 Radioaktívan jelölt GnRH származékok szintézise .....	49
4.1.4 A GnRH-III dimer származékainak előállítása .....	50
4.1.4.1 Szimmetrikus dimerek előállítása.....	50
4.1.4.2 GnRH-III aszimmetrikus dimerek előállítása.....	51
4.1.5 Fluoreszcensen jelölt GnRH-III származékok szintézise .....	52
4.1.6 Hatóanyag molekula funkcionálizálása .....	54
4.1.7 Hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok szintézise.....	56
4.2 GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum enzimatisz stabilitása .....	60
4.3 LH-felszabadulási teszt (LH-releasing assay) patkány hipofízis sejteken. GnRH-III dimerek hatása az LH-szekréción .....	64
4.4 Kötődésvizsgálat .....	66
4.5 Sejtbejutás vizsgálatok .....	67
4.5.1 Fluoreszcensen jelölt monomer és szimmetrikus GnRH-III dimer származékok sejtbejutási képességének meghatározása áramlási citometriával .....	68
4.5.2 Rövidített GnRH-III szekvenciák sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával .....	70

4.5.3	A humán GnRH-I hatása a fluoreszcensen jelölt GnRH-III monomer és dimer származékainak sejtbejutására .....	72
4.5.4	A [GnRH-III(CGFLG)] <sub>2</sub> hatása a fluoreszcensen jelölt [GnRH-III(CGFLG)] <sub>2</sub> sejtbejutására .....	74
4.5.5	Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok sejtek által történő felvétele .....	75
4.6	Hatóanyagot tartalmazó konjugátumok DNS-hez való kötődésének vizsgálata fluoreszcens spektroszkópiai módszerrel .....	76
4.7	A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) sejtbejutásának vizsgálata GnRH-I receptor elleni ellenanyaggal, illetve GnRH-I agonistával ([D-Trp <sup>6</sup> ]GnRH-I) .....	78
4.8	Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatisz hatásának meghatározása MTT-tesztel .....	81
4.9	A GnRH-III dimer, és az azokat alkotó monomer származékok apoptotikus hatásának meghatározása áramlási citometriával .....	83
4.10	GnRH-III származékok <i>in vitro</i> antiproliferatív hatása .....	85
4.10.1	Szimmetrikus GnRH-III dimerek .....	85
4.10.2	Aszimmetrikus GnRH-III dimerek .....	87
4.11	GnRH-III szimmetrikus dimerek <i>in vivo</i> tumorelles hatás .....	89
4.12	A Daunorubicin és a (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) <i>in vivo</i> toxicitásának meghatározása .....	90
4.13	Daunorubicin és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) <i>in vivo</i> antitumor hatása C26 tumort hordozó egerekben .....	91
5	Kísérleti rész .....	95
5.1	Általános protokollok .....	95
5.1.1	Szintézis .....	95
5.1.2	A peptidek hasítása .....	96
5.1.3	Tisztítás és analitikai paraméterek meghatározása (RP-HPLC és ESI-MS) .....	96
5.1.4	<i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> vizsgálatok .....	97
5.2	Szintetikus munka .....	98
5.2.1	Lineáris GnRH származékok szintézise .....	98
5.2.1.1	Natív GnRH molekulák szintézise .....	98
5.2.1.2	Rövidített GnRH-III fragmens peptidek szintézise .....	99
5.2.1.3	D-aminosavat tartalmazó GnRH származékok szintézise .....	100
5.2.1.4	Klóracetilcsoportot tartalmazó GnRH-III szintézise .....	100
5.2.2	Elágazó láncú GnRH származékok szintézise .....	101
5.2.2.1	Elágazó láncú GnRH-III származékok szintézise .....	101
5.2.2.2	GnRH-III(NH <sub>2</sub> -NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO) szintézise .....	103
5.2.2.3	Elágazó láncú GnRH-I származék szintézise .....	103
5.2.3	Radioaktívan jelölt GnRH származékok szintézise .....	104
5.2.4	GnRH-III származékok dimerizációja .....	105
5.2.4.1	Szimmetrikus dimerek előállítása .....	105
5.2.4.2	Aszimmetrikus dimerek előállítása .....	106
5.2.4.3	Fluoreszcensen jelölt GnRH-III származékok szintézise .....	106
5.2.5	Hatóanyag molekula funkcionálizálása .....	107
5.2.6	Hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok szintézise .....	108
5.3	Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum enzimatisz stabilitása .....	109
5.3.1	GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum emésztése kimotripsinnel .....	109

5.3.2	GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum stabilitásvizsgálata 90% humán szérumban	110
5.3.3	GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum stabilitásvizsgálata humán katepszin B-vel szemben	110
5.4	GnRH-III származékok endokrin hatásának tanulmányozása patkány hipofízis sejteken	111
5.5	Kötődésvizsgálat.....	111
5.6	Sejtbejutási vizsgálatok.....	112
5.6.1	GnRH-III és szimmetrikus dimer származékok sejtek általi felvételének vizsgálata áramlási citometriával.....	112
5.6.2	Rövidített GnRH-III szekvenciák sejtbejutási képességének vizsgálata áramlási citometria módszerével.....	113
5.6.3	A humán GnRH-I hatásának vizsgálata a fluoreszcensen jelölt GnRH-III monomer és dimer származékainak sejtbejutására.....	113
5.6.4	A [GnRH-III(CGFLG)] <sub>2</sub> hatásának tanulmányozása a fluoreszcensen jelölt [GnRH-III(CGFLG)] <sub>2</sub> sejtbejutására.....	114
5.6.5	Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok sejtek által történő felvétele.....	114
5.7	Hatóanyagot tartalmazó konjugátumok DNS-hez való kötődésének vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópia módszerével.....	114
5.8	GnRH-I receptor ellenes ellenanyag, illetve GnRH-I agonista ([D-Trp6]GnRH-I) hatása a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum sejtbejutására.....	115
5.9	Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatisztikus hatása.....	116
5.10	GnRH-III dimer származékainak apoptotikus hatása.....	116
5.11	GnRH-III származékok <i>in vitro</i> antiproliferatív hatása.....	117
5.12	GnRH-III származékok <i>in vivo</i> toxicitása és antitumor hatásának tanulmányozása.....	117
5.12.1	GnRH-III szimmetrikus dimerek <i>in vivo</i> antitumor hatása.....	117
5.12.2	Daunorubicin és daunorubicin tartalmú konjugátum <i>in vivo</i> toxicitásának meghatározása.....	118
5.12.3	Daunorubicin és daunorubicin tartalmú konjugátum <i>in vivo</i> antitumor hatása C26 karcinómán	118
5.12.3.1	1. kísérlet.....	118
5.12.3.2	2. kísérlet.....	119
6	Összefoglalás.....	120
7	Irodalomjegyzék.....	122
	Összefoglalás.....	137
	Summary.....	138

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Hollósi Miklós és Dr. Perczel András tanszékvezető egyetemi tanároknak, és Dr. Hudecz Ferenc egyetemi tanárnak, hogy munkámat az ELTE Kémiai Intézetének Szerves Kémiai Tanszékén, valamint az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportjában lehetővé tették.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak munkám irányítását, segítőkészségét és türelmét.

Köszönetet mondok továbbá:

**Dr. Schlosser Gittának és Bai Katalin Boglárkának** (ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport) az ESI-MS mérésekért,

**Dr. Marilena Maneanak** (Konstanzi Egyetem, Kémiai Tanszék, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium) az enzimatis vizsgálatokért,

**Dr. Bősze Szilviának és Orbán Erikának** (ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport) az *in vitro* sejtbejutás és citosztatikus hatás meghatározására szolgáló kísérletekben nyújtott segítségéért,

**Dr. Tóth Géának és Dr Farkas Jutkának** (MTA-SZBK Biokémiai Intézet Izotóp labor) a triciált GnRH származékok előállításában nyújtott segítségéért,

**Dr. Vincze Borbálának és Kapuvári Bencének**, valamint az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztály Izotóp labor dolgozóinak a kötődésvizsgálatokért,

**Dr. Csuka Orsolya** és az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztály dolgozóinak az *in vitro* antiproliferációs vizsgálatokért,

**Radnai Lászlónak** (ELTE Biológiai Tanszékcsoport, Biokémia Tanszék) a fluoreszcens mérésekért,

**Dr. Kovács Magdolnának** és a Pécsi Orvostudományi Egyetem Anatómiai Intézet munkatársainak az LH-szekréciós mérésekért,

**Dr. Gaál Dezsőnek, Dr. Fejeda Miguelnek és Schulz Ákosnak** (Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztály) az *in vivo* vizsgálatokért, valamint a kutatócsoport tagjainak segítségükért és támogatásukért.

## Rövidítésjegyzék

$\Delta$ Pro	3,4-dehidro-prolin
A <sub>2</sub> bu	2,4-diaminobutánsav
AC	adenil cikláz
Ac	acetyl
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
Ac <sub>2</sub> O	ecetsav-anhidrid
Aoa	aminooxiecetsav
AP-I	aktivátor protein I
A <sub>2</sub> pr	2,3-diaminopropionsav
ATP	adenozin-trifoszfát
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz(dimetilamino)foszfónium hexafluorofoszfát
BrZ	2-bróm-benziloxikarbonil
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -butil
Bzl	benzil
CE	karboxiészteráz enzim
CF	5(6)-karboxifluoreszcein
CF-OPcp	5(6)-karboxifluoreszcein-pentaklórfenil-észter
Ci	Curie (radioaktivitás mértékegysége)
ClAc-OPcp	klórecetsav-pentaklórfenil-észter
Dau	daunorubicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCC	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM	diklórmétán
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIEA	<i>N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxiribonukleinsav
Dox	doxorubicin

DTT	1,4- <i>DL</i> -ditiotritol
E2	ösztadiol
EA	etilamid
EDT	1,2-etándiol
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ERK 1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2 (extracelluláris szignálizáció szabályozta kináz)
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
FCS	fetal calf serum (magzati borjú szérum)
FITC	fluoreszcein izotiocianát
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
FSH	follikulus stimuláló hormon
pGlu, <E	piroglutaminsav
GnRH	gonadotrop-releasing hormon
GnRH-IR	I-es típusú GnRH receptor
GnRH-IIR	II-es típusú GnRH receptor
GPCR	G-protein kapcsolt receptor (G Protein Coupled Receptor)
<sup>3</sup> H, <sup>3</sup> T	trícium
HF	hidrogénfluorid
HMAQG	glutaril-2-(hidroximetil)antrakinon
HOBt	1-hidroxibenztriazol
HPMA	<i>N</i> -(2-hidroxipropil) metakrilamid
IGF	inzulin-típusú növekedési faktor
IP3	inozitol triszfoszfát
JNK	C-Jun <i>N</i> -terminális kináz
LC/MS	Folyadékkromatográfia/tömegspektrometria (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LH	luteinizáló hormon
LHRH	luteinizáló hormont felszabadító hormon
MALDI-TOF MS	MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-Time of flight tömegspektrometria
MAPK	mitogén aktivált protein kináz

MBHA	4-metilbenzhydriamin
MDR	(multidrug-resistance), multirezisztens
Meb	4-metilbenzil
<i>D</i> -Mel	4-[bisz(2-klóretil)amino]fenilalanin
M <sub>mo</sub>	monoizotópos molekulatömeg
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid
Mtx	metotrexát (4-amino- <i>N</i> -10-metilpteroilglutaminsav)
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotidfoszfát redukált formája
Nal(2)	3-(2-naftil)alanin
NaOAc	nátrium-acetát
NEAA	nem esszenciális aminosav
NFκB	nukleáris faktor-κB
OSu	<i>N</i> -hidroxisukcinimid-észter
Pal(3)	3-(3-piridil)alanin
Pcp-OH	pentaklórfenol
PgP 170	P-170 glikoprotein
Phe(4Cl)	4-klór-fenilalanin
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PTP	foszfortirozin foszfataz
PTX	pertussis toxin
RIA	radio immuno assay
mRNS	messenger RNS (ribonukleinsav)
RP-HPLC	fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
Sal	szalicilaldehid
SFM	szérummentes médium
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis
TFA	trifluorecetsav
Tos	tozil
Trt	tritol
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
Z	benziloxikarbonil

A *D*-aminosavakat hárombetűs és egybetűs kóddal is jelölöm a dolgozatban.

Hárombetűs kód esetén a Fmoc-*D*-Aaa-OH formát használva, míg egybetűs kód esetén az aminosav egybetűs kódját kis betűvel írom.



## Bevezetés

A WHO adatai alapján évente több mint 5 millió férfi és csaknem 5 millió nő esetén diagnosztizálnak rosszindulatú daganatos megbetegedést a világon. Amennyiben nem tesznek megfelelő lépéseket az elkövetkezendő 10 évben, több mint 80 millió ember halálát okozhatja majd rákos megbetegedés. A különböző szervek daganatos megbetegedéseinek statisztikai megoszlása hazánkban is hasonló, mint a világ többi országában. A tumoros elváltozások diagnosztizálását követően, a daganat méretétől függő módon alkalmazhatnak sebészeti beavatkozást vagy terápiás kezelést. A sebészeti beavatkozás csak szolid tumorok esetén valósítható meg, nem-szolid tumoroknál csak a kemoterápia lehet célravezető. A sebészeti beavatkozást minden esetben kemoterápia, vagy sugárterápia követi, hogy megelőzzék a daganat újbóli kialakulását, illetve más szövetekre való áttérjedését, vagyis a metasztázisok képződését. Sebészeti eljárással, biztonsággal a benignus, jól körülhatárolt burokkal rendelkező daganatok távolíthatók el, míg a malignus elváltozások esetében még napjainkban is bizonytalanul állapítható meg egyes tumorokban a daganatos és a normál szövet határa. Néhány daganatfajtánál (mellkas<sup>1</sup>, nyelőcső<sup>2</sup>, gyomor<sup>3</sup>, máj<sup>4</sup>, mellékvese<sup>5</sup>, vese<sup>6</sup>, prosztata<sup>7</sup>, hasnyálmirigy<sup>8</sup>, vastagbél<sup>9</sup>) már kipróbálás alatt van a hagyományos sebészeti beavatkozás mellett a laparoszkópos eljárás is, bár még nem bizonyított egyértelműen a hatásossága. A sebészeti beavatkozást követő terápiás kezelés lehet kemoterápia, citosztatikus tulajdonsággal rendelkező gyógyszerekkel<sup>10-12</sup>, vagy pedig radioizotópokkal történő besugárzás. Számos daganattípus esetében a két terápiát kombinálva alkalmazzák a hatékonyabb kezelés érdekében. Noha számos új gyógyszer és módszer ismeretes már a daganatterápiában, mégis a költséghatékonyság mint fő szempont játszik szerepet a terápia kiválasztásában. Ezért a diagnosztizált és metasztatikus daganatok esetében egyaránt a kemoterápia a fő kezelési mód, úgynevezett koktélok felhasználásával. Ezek a koktélok több, hatásos, a sejtek osztódását különböző módon gátló citosztatikumot tartalmaznak eltérő mennyiségben a hatásuk növelése érdekében. A napjainkban alkalmazott kemoterápiás szerek (pl.: daunorubicin, doxorubicin, metotrexát, ciszplatin, taxol) legfőbb hátránya, hogy gyorsan kiürülnek a véráramból, valamint, hogy nem szelektívek és specifikusak, hiszen ezek a citosztatikus szerek nemcsak a tumoros sejteket támadják, hanem az egészséges, főleg a gyorsan osztódó sejteket (pl.: limfociták, máj-, és vese sejtek) is<sup>10-13</sup>. A daganatos sejtek igen gyorsan képesek az alkalmazott kemoterápiás gyógyszerekkel szemben rezisztenssé válni, így hamar hatástalanok lesznek a daganatra, míg az egészséges sejteket tovább pusztítják. Ezért a daganatellenes

szerek kutatásának fő célja a napjainkban alkalmazott gyógyszereknél hatásosabb, szelektívebb tumorellenes molekulák előállítása. Az irányított vagy célzott tumorterápia a tumorok felszínén megjelenő speciális membránképleteket, pl. receptorokat állítja a terápia célkeresztjébe. Számos tumor nagy mennyiségben fejez ki (overexpresszál) receptorokat<sup>13-16</sup>, és/vagy más sejtfelszíni struktúrákat<sup>17-23</sup>. Ezek ismeretében képesek vagyunk olyan ligandumok előállítására, melyek főleg a tumor felszínén lévő struktúrához kötődnek, így a citotoxikus/ citosztatikus tulajdonsággal rendelkező hatóanyagot célzottan a daganatsejthez irányítják. Számos vizsgálat azt mutatta, hogy a gonadotrop-releasing hormon (GnRH) receptora(i) a legtöbb tumorsejt típuson (emlő-, endometrium-, petefészek-, prosztata-, száj-, gége-, vese-, agy-, hasnyálmirigy-, máj-, vastagbél daganatok, továbbá melanómák, limfómák<sup>13, 24-26</sup>) jelentős mennyiségben expresszálódik, míg az egészséges sejtek többségén mennyiségük elhanyagolható. Bár a reproduktív szervek (endometrium, petefészek, prosztata<sup>24-26</sup>) sejtjein nagyobb mennyiségben fordulnak elő a GnRH receptorok, de még ezeken a sejteken is kevesebb a receptorok száma és sűrűsége a tumorsejtekhez képest. Ez a megfigyelés ad lehetőséget arra, hogy a GnRH peptideket mint szelektív irányító molekulákat használják a célzott tumorterápiában. Mivel számos GnRH analógnak önmagában is van tumorellenes hatása, egy jól megválasztott GnRH-hatóanyag kombinációval szelektív és igen hatékony (a GnRH és a hatóanyag szinergista vagy additív hatása folytán) konjugátumokat állíthatunk elő.

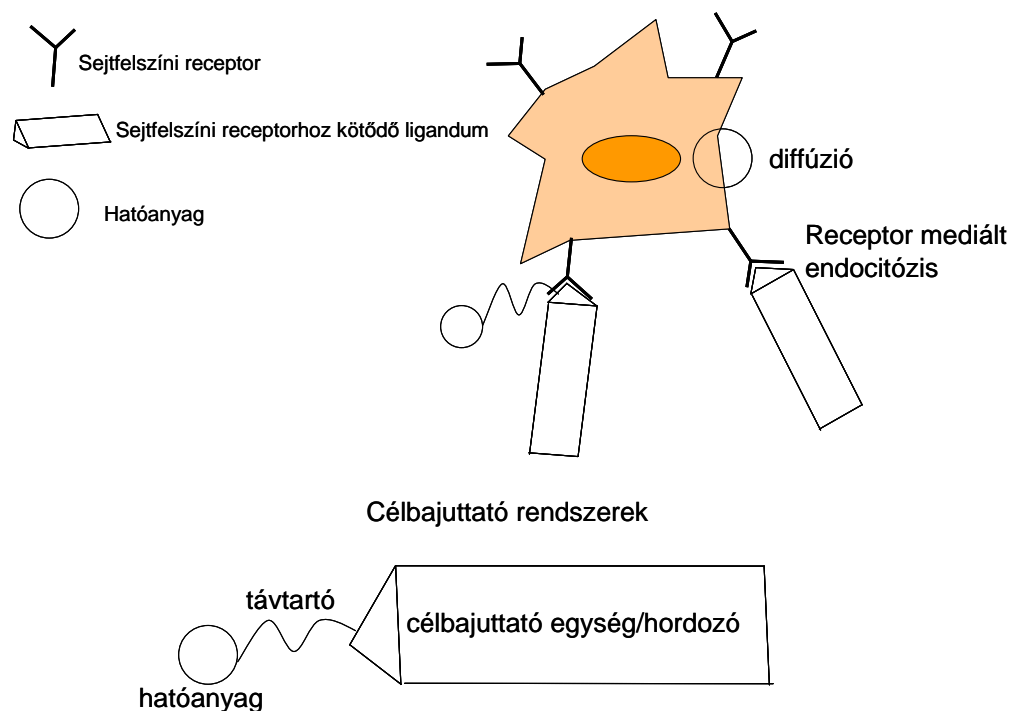
Doktori munkám során arra törekedtem, hogy olyan GnRH származékokat állítsak elő, amelyek önmagukban is jelentős tumorellenes hatással rendelkeznek és alkalmasak hatóanyag kapcsolására. Ezeket a GnRH-hatóanyag konjugátumokat mint potenciális gyógyszer-molekulákat az irányított tumorterápia területén kívánjuk hasznosítani.

# 1 Irodalmi áttekintés

## 1.1 A gyógyszerek célzott sejtbe juttatása (targetálás)

A gyógyszerek célszervhez, célszövethez, illetve a célsejtbe történő minél szelektívebb eljuttatása jelentősen befolyásolhatja a gyógyszerek hatékonyságát. Különösen fontos ez az igen alacsony terápiás indexű (az a koncentráció tartomány, ahol az adott szer kiváltja a kívánt hatást és még nem okoz veszélyes mellékhatást) citotoxikus anyagok esetében, ahol a normális szövetek károsodása gyakran a kezelés felfüggesztését, és így a daganat sikertelen kezelését eredményezi.

Az alkalmazott citosztaticumokkal szembeni rezisztencia kialakulása, valamint a kemoterápiás szerek által kiváltott számos mellékhatás különböző speciális rendszerek tervezését tették szükségessé, amelyek képesek a citosztaticus anyagokat szelektíven a daganatsejtekhez eljuttatni a normál sejtek károsítása nélkül (1. ábra).



1. ábra: Célzott terápiára alkalmas sejtbejuttató rendszerek vázlatos ábrázolása

A hatóanyag szállító rendszerek (Drug Delivery Systems (DDS)) általában három fő komponensből állnak: célbajuttató egység(ek), hordozó molekula, hatóanyag(ok). Számos esetben egy molekula jelentheti a célbajuttató egységet és a hordozót<sup>27</sup>.

A hatóanyagok célbajuttatásának stratégiáját meghatározza a célsejt (daganatsejt) fokozott endocitózisra való képessége, illetve a felszínén található specifikus receptorok minősége. Ily módon hordozóként szolgálhatnak szintetikus vagy természetes polimerek, illetve a receptorhoz kötődő ligandumok, amelyek molekuláris szerkezete szintén sokféle lehet (fehérje- vagy szénhidrát típusú molekulák, peptidhormonok, stb.)<sup>28-30</sup>.

A következőkben néhány irodalmi példán keresztül szeretném bemutatni a célzott sejtbejuttató rendszerek komponenseit.

Kutatások folynak hatóanyagok szintetikus vagy természetes polimerekhez (akrilamid<sup>31</sup>, zselatin<sup>32</sup>, szérum albumin<sup>33</sup>) kötésére, hogy a biológiailag aktív anyagokat a környező szövetek károsítása nélkül juttassák tumorsejtekbe. Egy hatékony daganatellenes gyógyszer polimer hordozóhoz történő kapcsolása átmenetileg inaktiválhatja ugyan a gyógyszert, de ugyanakkor jelentős változást eredményezhet annak szervezeten belüli megoszlásában.

A kis molekulatömegű hatóanyagok diffúzióval átjutnak a sejtmembránon, polimerhez kötötten valószínűleg endocitózis útján kerülhetnek be a sejtbe. Mivel a tumorsejtek fokozott endocitózist mutatnak a normál sejtekhez képest, a konjugátumok tumorsejtek által történő felvétele fokozottabb lehet növelve a hatóanyag szelektivitását. Az alkalmazott polimer nem lehet toxikus, illetve immunogén.

Az *N*-(2-hidroxipropil) metakrilamid (HPMA) kopolimer konjugátumokat széles körben vizsgálták a klinikumban. A kopolimert önmagában is használták hatóanyag szállítására<sup>34</sup>, de sejtspecifikus célbajuttató csoportokat is kapcsoltak hozzá pl. galaktózt<sup>35, 36</sup> a májba, és melanocita stimuláló hormont<sup>37</sup> a melanoma sejtekbe történő targetáláshoz.

Laboratóriumunkban elágazó láncú polimer polipeptideket állítottak elő, melyek gerincét poli[*L*-Lys] alkotja. Ezek a polimerek makromolekulák szállítására alkalmasak<sup>38, 39</sup>. A polimer oldalláncát rövid, 3-6 aminosav hosszúságú oligo(*DL*-Ala) egységek alkotják. Az oldallánc *N*- vagy *C*-terminálisára optikailag aktív aminosavat kapcsolnak (poli[Lys(*X*<sub>*i*</sub>-*DL*-Ala<sub>*m*</sub>)] (*XAK*) és poli[Lys(*DL*-Ala<sub>*m*</sub>-*X*<sub>*i*</sub>)] (*AXK*), ahol *i* = 1 és *m* = 3-6). Az oldalláncot alkotó aminosavak minőségétől függően előállíthatók pozitív töltésű, negatív töltéssel rendelkező, valamint amfoter polimerek. Az aminosav típusától, illetve töltésétől függően a polimereknek más-más a biodisztribúciója (szervezetbeni eloszlása, dúsulása). A vérben az amfoter jellegű EAK, illetve a polikationos SAK polimerek tartózkodnak a legtovább, így ezek a

legalkalmasabbak peptidek, hatóanyagok, stb szállítására<sup>40, 41</sup>. A polimerek peptid jellegük folytán biodegradálisek, amely fontos szempont a polimer hordozók biológiai alkalmazhatóságának szempontjából.

Az oligotuftsinnak származékai ugyancsak peptid jellegű hordozóként szolgálhatnak hatóanyagok szállítására. Az IgG molekula nehézláncának Fc régiójában található tetrapeptid szekvenciát (289-292, TKPR) nevezzük tuftsinnak<sup>42, 43</sup>. A tetrapeptidet, amelyet két lépésben, enzimatisz hasítás során keletkezik, a Tufts egyetemről (Medford, MA, USA) nevezték el, ahol felfedezték és számos kedvező biológiai hatását azonosították. *Mező és munkatársai* a tuftsinnak egyik analógiájából (TKPKG) építették fel a hordozó molekulát. A különböző hosszúságú pentamer egységekből felépülő oligomerek közös jellemzője, hogy nem toxikusak, nem immunogének, de immunstimuláló hatással rendelkeznek. A polimerek alkalmazhatóságának egyik korlátja az oldhatóság. A tuftsinnak típusú oligomer hordozók rendkívül jól oldódó vegyületek<sup>44</sup>. A tuftsinnak oligomer egységeként két lizint is tartalmaz, mely lehetőséget nyújt specifikus ligandok hozzákapsolására. A hordozó molekulán több célbavivő egység, illetve hatóanyag helyezhető el. Így potenciális hordozó molekulaként szolgálhatnak különböző biológiailag aktív peptidek, hatóanyagok célzott sejtbejuttatására<sup>45</sup>. Bár az oligotuftsinnak alapú hordozók sejtbejuttatásának mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, úgy néz ki, hogy ez a vegyület átmenetet képez a polimerek és a receptoron kötődő kisebb peptidek sejtbejuttatása között. Kiseb koncentrációban a receptor közvetített út dominál, míg nagyobb koncentrációban a hordozó fagocitózist stimuláló hatása miatt az endocitózis kerül előtérbe. A peptid jellegéből adódóan a sejtpenetráció sem kizárt.

A peptidek önmagukban mint hordozó molekulák is előtérbe kerültek a célzott tumorterápia kutatási területein. Elsőként növekedési faktorokat, interleukinokat, valamint hormonokat alkalmaztak toxinok, citosztatikumok célzott tumorsejtbe juttatására, kihasználva azt a tényt, hogy a tumoros sejtek rendelkeznek ezen peptidek receptoraival<sup>46-48</sup>. Ezekben a konjugátumokban a hatóanyag minden esetben kovalens kötéssel kapcsolódik a hordozóként szolgáló peptidhez közvetlenül, vagy távtartón keresztül<sup>46-52</sup>.

A kutatások arra irányulnak, hogy minél szelektívebben tudják ezek a konjugátumok a hatóanyagot a célsejtekhez juttatni. Ezért olyan molekuláris célpontok válnak a figyelem középpontjává, amelyek főleg a tumoros sejtekre jellemzők, az egészséges sejtek nem, vagy csak kis mértékben fejezik ki. Az egyik ilyen célpont a GnRH receptor lehet, amelyet a hipofízisen kívül csak a reprodukív szervek némelyike fejez ki normál esetben. Viszont a nőgyógyászati daganatok (peptefészek, endometrium<sup>24, 25</sup>, emlő<sup>26</sup>), továbbá prosztatata<sup>26</sup> és vastagbél<sup>53</sup> valamint számos más karcinóma overexpresszál GnRH receptort. Ezért a GnRH

analógok alkalmasak lehetnek hordozóként az irányított tumorterápiára GnRH receptor pozitív sejtek esetén. Bizonyos GnRH származékok előnye az általánosan alkalmazott hordozó vegyületekkel szemben, hogy önmagukban is tumorelles tulajdonsággal rendelkeznek. Figyelembe kell azonban venni, hogy a GnRH analógok hatásukat kétféleképpen képesek kifejteni: direkt és indirekt módon. Direkt határról beszélünk akkor, ha a tumorsejt felszínén található GnRH receptorhoz kötődve fejtik ki tumorelles hatásukat. Indirekt hatás kifejtésére akkor kerül sor, ha a GnRH analóg a hipotalamusz – hipofízis - ivarmirigy endokrin rendszert befolyásolja. Az indirekt hatás következtében átmenetileg „kémiai kasztráció” (a szabályozási folyamatban egy lépcsőfok kiesését jelenti, ami felborítja az egész folyamatot. A kémiai kasztrációt előidéző molekula megvonásával a szabályozási folyamat visszaáll eredeti állapotába) jön létre, amely hormonfüggő tumorok esetén lehet előnyös.

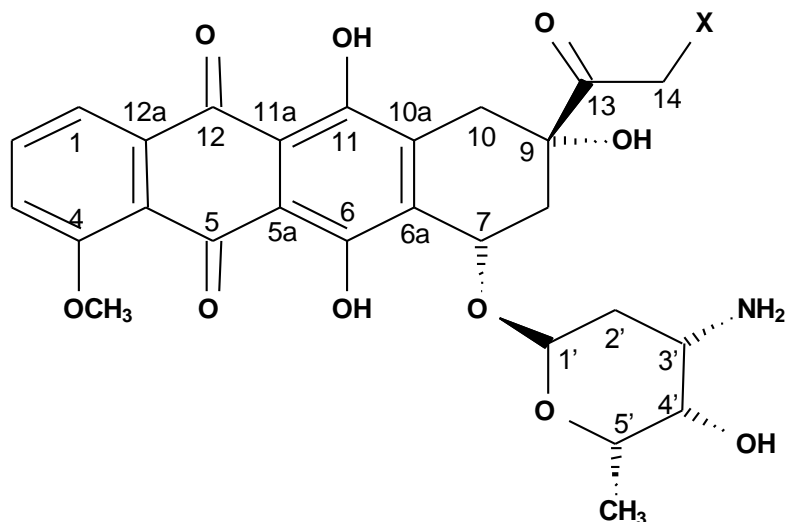
A célzott kemoterápia előnyben részesíti azokat a GnRH származékokat, amelyek endokrin, indirekt hatással nem rendelkeznek, hanem csak a tumoros sejteken fejtik ki hatásukat. GnRH analógokat alkalmaztak közvetlenül hatóanyaghoz kapcsolva (hordozó és irányító funkció egyben), illetve más hordozóhoz kötve, amikor mint irányító molekula szerepelt.

A célbajuttató rendszerek harmadik elemét a hatóanyagok jelentik. Dolgozatomban a leggyakrabban alkalmazott citosztatikus vegyületek közül az antibiotikumok családjába tartozó antraciklineket (daunorubicin és doxorubicin) ismertetem bővebben.

Az antraciklinek kémiai jellemzője a tetraciklusos (antraciklin) gyűrű, melyhez aminocukor (daunózamin) és egy alkil oldallánc csatlakozik. A két középső gyűrűn lévő kinon-hidroxikinon csoport elektrontovábbító szerepet tölt be és aktív szabadgyökök (pl. hidroxilgyökök) képződését teszi lehetővé.

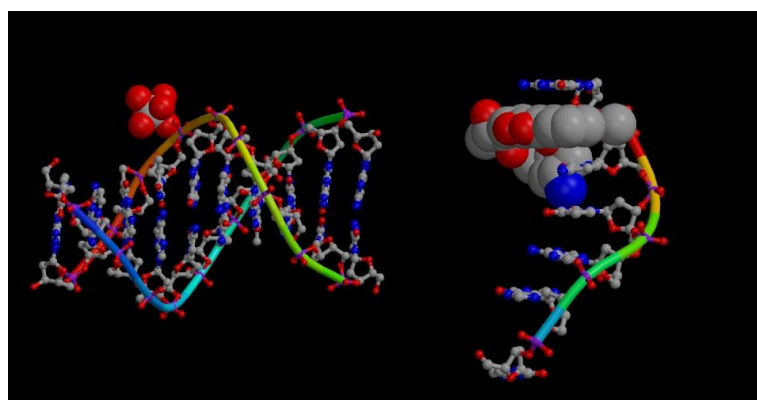
Az antraciklin szerkezetű antibiotikumok széles körben alkalmazott daganatellenes hatóanyagcsaládot alkotnak, melynek két tagját, a doxorubicint és a daunorubicint a *Streptomyces peucetius* termeli. A két vegyület szerkezete csak annyiban tér el egymástól, hogy a doxorubicin esetében a C14 pozícióban hidroxilcsoport helyezkedik el, míg a daunorubicinnél hidrogén (2. ábra).

A második generációs antraciklinek, az epirubicin és az idarubicin az első generációs antraciklinek szintetikus származékai.



2. ábra: A daunorubicin ( $X=H$ ) és a doxorubicin ( $X=OH$ ) szerkezete

Az antraciklinek biológiai hatásában két mechanizmusnak lehet szerepet tulajdonítani. Az első, hogy a DNS két polinukleotid lánc közé beékelődve (interkaláció) megszüntetik a két láncot összekapcsoló hidrogénhid kötések, letekerik a kettősspirál érintett szakaszát, amely feltehetően kedvez a topoizoméráz II-vel történő kapcsolatuknak (3. ábra). A topoizoméráz II az antraciklinek jelenlétében nem tudja végrehajtani a DNS konformációt átalakító működésének következő szakaszát (a tört végek összeillesztését), így a DNS fragmentálódik.



3. ábra: Az antraciklinek interkalációja DNS-sel  
<http://www.jonathanpmiller.com/intercalation>

A második lehetséges mechanizmus szerint az antraciklinek kémiai szerkezete aktív szabadgyökök képződésére ad lehetőséget. Ez a folyamat úgy megy végbe, hogy a citokróm P450 reduktáz közreműködésével NADPH jelenlétében az antraciklinek szemikinin származékká alakulnak, miközben elektront adnak át az oxigénnek és a vastartalmú fehérjének, így aktív szabadgyökök képződnek.

A két mechanizmus kizárólagos szerepe nem tisztázott. Lehetséges, hogy mindkettőnek szerepe van a biológiai hatásban. Jelen vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a DNS-hez való kötődés határozza meg a sejtsztódást gátló hatást; a kardiotoxicitást az aktív szabadgyökök képződése okozza. Ezt támasztja alá az, hogy a katalázt és glutation-peroxidázt nem tartalmazó szívizom kevésbé képes az aktív szabadgyökökkel szemben védekezni.

Az antraciklinek kardiotoxikus hatása változatlan tumorsejt növekedést gátló hatás mellett csökkenthető az antioxidáns dexrazoxan (Cardioxan) kezeléssel. A daunorubicin kevésbé kardiotoxikus, ugyanis a 14-OH hiánya miatt kevésbé hajlamos a gyökképződésre<sup>54</sup>,<sup>55</sup>. Hatékonyságuk korlátozó tényezője a rezisztencia, amelyben jelentős szerep tulajdonítható az MDR gén termékének a PgP-170-nek, amely az antraciklineket eltávolítja a tumorsejtekből<sup>56</sup>.

## **1.2 A GnRH peptidek előfordulása és élettani hatása**

A gonadotrop-releasing hormon (GnRH-I: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>), vagy más néven LHRH (luteinizáló hormon-releasing hormon) a szaporodás hormonális kaszkádjának központi molekulája, melyet első ízben emlős hipotalamuszból izoláltak<sup>57-59</sup>. Az evolúció több mint 500 millió éve alatt 23 GnRH peptid izoforma alakult ki (4. ábra).



Az előgerinchúrosok azon törzsfajlódás elején lévő élőlények, melyekben már megtalálható a GnRH-nak több formája. Az evolúció előrehaladtával egyre csökken a különböző GnRH formák jelenléte, emberben már csak két izoforma mutatható ki.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Emlős	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Tengeri malac	pGlu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Csirke I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Varangy	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Tengeri keszeg	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Lazac	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Macskahal	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Hering	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Tüskécápa	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Csirke II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Nagy tengeri ingola III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Nagy tengeri ingola I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Cheliosoma I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Cheliosoma II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona III	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona VI	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Phe	Met	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona V	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Met	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona VI	pGlu	His	Trp	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Ciona VII	pGlu	His	Trp	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Pro	Gly NH <sub>2</sub>
Polip	pGlu	Asn	Tyr	Ser	Phe	Ser	Trp	His	Pro	Gly NH <sub>2</sub>

Asn Gly

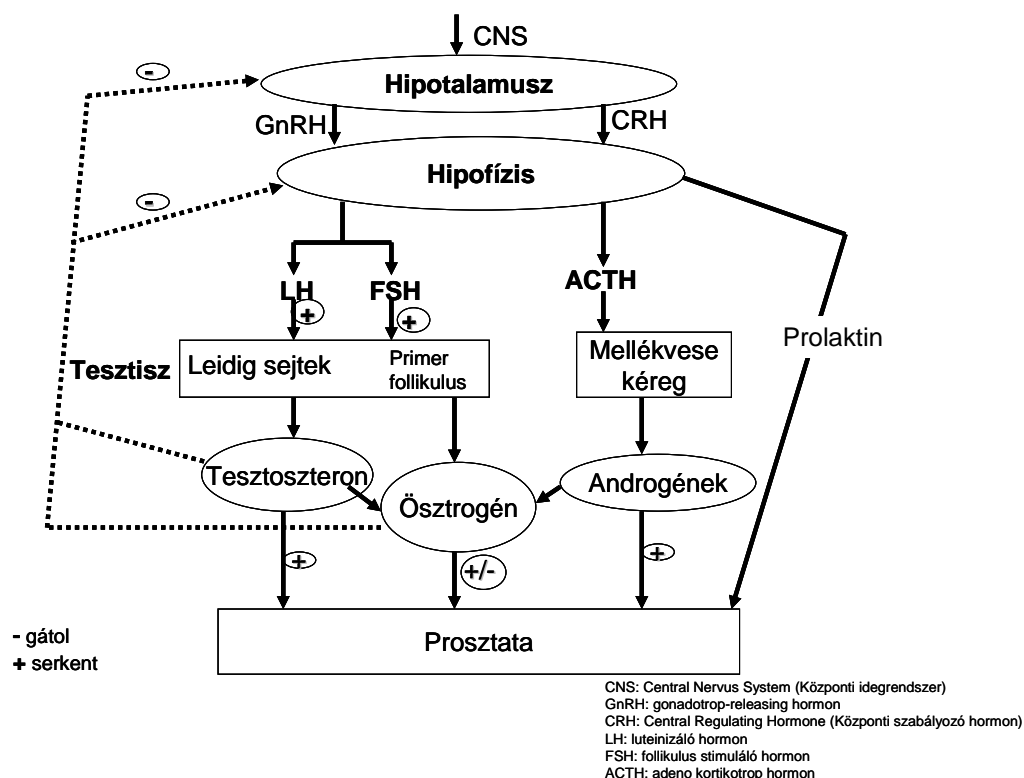
4. ábra: A természetben előforduló GnRH izoformái. Eredeti ábra: R.P. Millar *Animal Reproduction Science* 88 (2005) 5–28

Az előgerinchúrosokban és a gerincesekben sokféle funkciót betölthet, úgy, mint neuroendokrin (növekedési hormon felszabadulás egyes halfajokban), parakrin (méhlepény, ivarmirigy), autokrin (GnRH neuronok, immunsejtek, emlő- és prosztataglandok), illetve neurotranszmitter/neuromodulátor a központi és perifériális idegrendszerben (szimpatikus ganglionok, középagy) egyaránt (5. ábra)<sup>60</sup>.

Az ivarmirigyek direkt szabályozása már a gerincesek evolúciójának korai szakaszában feladta lehetett a GnRH peptideknek, melyet bizonyít az is, hogy zsákállatkák idegi szövetében számos GnRH formát izoláltak<sup>61, 62</sup>.

A neuron egyike azon korai evolúciós sejteknek, mely GnRH peptideket termel. Különböző gerinces fajok ivarmirigyében a GnRH termelődése, valamint a GnRH receptorok megléte ugyancsak ezt a korai evolúciós megjelenést támasztja alá.

A hipofízisbeli szabályozás neuroendokrin szerepe csak az evolúció későbbi szakaszában alakult ki.



5. ábra: A GnRH szerepe a reprodukció szabályozásában

A GnRH peptideknek két formája fejeződik ki az emberi szervezetben. Az emlős I típusú GnRH (GnRH-I) és a GnRH-II (pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>)<sup>63</sup>. Ez utóbbit első ízben csirke agyban azonosították, de mindenütt megtalálható a gerincesek között a csontos halaktól az emberig<sup>60</sup>. Az állatvilágban való elterjedése alapján a GnRH-II evolúciós megjelenése előbbre tehető, mint a GnRH-I-é. A szervezetbeni előfordulását tekintve neurotranszmitter/neuromodulátor szerepet tulajdonítanak neki, de pontos funkciója máig nem ismert.

A GnRH-I a hipotalamusz speciális neuronjaiban képződik prekursor polipeptid formájában, melyből enzimek hatására hasad ki az aktív hormon és granulumokba zárva tárolódik az őt termelő idegvégződéseiben<sup>64, 65</sup>. Ezt követően a hormon periodikusan szabadul fel<sup>64</sup>. Minden GnRH-I pulzus LH (luteinizáló hormon) és FSH (follikulus stimuláló hormon) szekréciót stimulál (5. ábra). Az utóbbi hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Az LH-szekréció mértéke az ovulációs ciklussal változik, az ovuláció idején a legmagasabb.

A GnRH-II termelődésének helye nem olyan jól körülhatárolt, mint a GnRH-I-é. Az agy számos részén, valamint perifériális szövetekben egyaránt termelődik, melyet immunhisztokémiai módszer alkalmazásával igazoltak selyemmajomban és emberben<sup>66, 67</sup>. A GnRH-II termelődésének fő helye a hipotalamusz középső régiója, amely fontos központja a nemihormon termelés szabályozásának. Termelődhet még a hipotalamusszal kapcsolatban álló középagyban, és a limbikus rendszerben<sup>66, 68-70</sup>. Emberben a limbikus rendszeren belül a hippocampusban és az amigdala régióiban azonosítottak GnRH-II termelő neuronokat<sup>71-73</sup>. A limbikus rendszerben való termelődés arra utal, hogy a GnRH-II a nemi hormonok szabályozásán túl a szexuális viselkedésben is szerepet játszhat. GnRH-II termelődését számos perifériás szervben is kimutatták, úgy mint vese, csontvelő, prosztata<sup>63</sup>, endometrium<sup>74</sup>, ovárium felszíni epiteliális sejtek<sup>75</sup>, granulóza sejtek<sup>76</sup>, emlő szövet<sup>77</sup>. Képződését kimutatták továbbá ovárium epiteliális- és emlőtumorokban is<sup>75, 77</sup>. A GnRH-II termelődése, valamint a GnRH-II receptor kifejeződése szaporodási rendszer szerveiben<sup>68, 74-79</sup> (placenta, endometrium, emlő, prosztata és az ivarmirigyek), arra utal, hogy a GnRH-II szerepet játszik ezen szervek, szövetek működésének szabályozásában.

### 1.3 A GnRH peptidek szerkezet-hatás összefüggése

A 4. ábrán látható, hogy az egyes GnRH izoformák *N*-és *C*-terminálisának szekvenciája három kivétellel (tengeri malac, nagy tengeri ingola I és polip) változatlan maradt az evolúciós fejlődés során. Ebből arra következtethetünk, hogy ezek a régiók kritikus fontosságúak a receptorhoz való kötődésben, illetve a receptor által közvetített jelátviteli folyamatok aktiválásában.

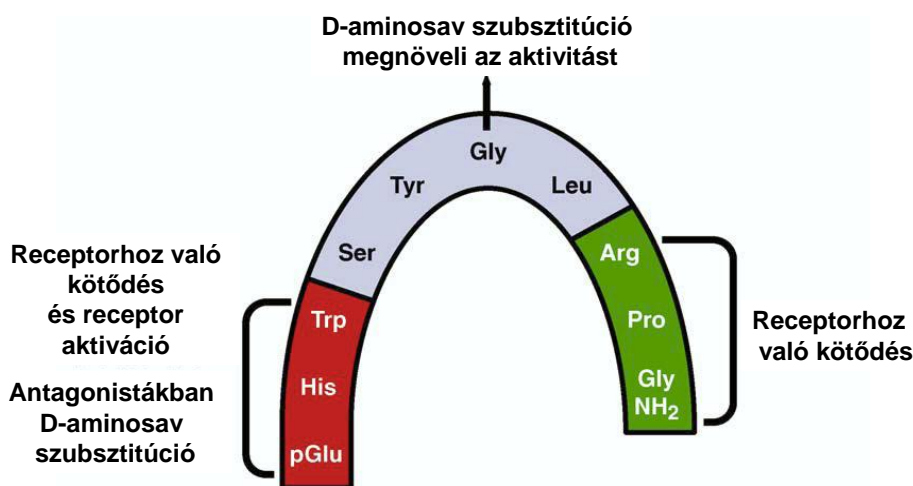
Számos analógot fejlesztettek ki, hogy a centrális régió variabilitásának okát tanulmányozzák. A kapott szerkezet/receptor aktivitás adatok alapján a peptid nyolcas pozíciója a legvariábilisabb, majd ezt követi a hatos, ötös és végül a hetes pozíció variabilitása. A nyolcas pozíció nagymértékű változtathatósága arra enged következtetni, hogy bármilyen helyettesítés megengedett ebben a pozícióban. Ez a következtetés azonban nem állja meg a helyét az emlős GnRH-I esetében, ugyanis az Arg<sup>8</sup> (a szekvencia 8. pozíciójában található arginin aminosav) fontos szerepet játszik a GnRH-I receptorok ligandum specificitásában<sup>69, 80-83</sup>.

Emlősök esetén a ligandum konformációja szigorú követelmény a hipofízisbeli GnRH-I receptorhoz való kötődés szempontjából<sup>69, 70, 81, 82, 84, 85</sup>. Amennyiben a GnRH-I kötődik a receptorhoz,  $\beta$ -II turn konformációt vesz fel, melyet az Arg<sup>8</sup> és a receptor

extracelluláris 3. loopja között kialakuló kölcsönhatás stabilizál<sup>69, 86</sup>. A hatos pozícióban lévő glicin *D*-aminosavra történő cseréje (kb. tízszeres) stabilizáló hatást eredményez.

Az előállított számos analóg hatását vizsgálva általánosan elmondható, hogy a hatos pozícióban lévő glicin *D*-aminosav cseréje agonista származékot, míg a receptorhoz való kötődésért, illetve aktivációért felelős *C*-terminális régió bármely aminosavának *D*-aminosavra történő cseréje antagonistá tulajdonságú analógot eredményez (6. ábra). Amennyiben a hatos vagy tízes, illetve mindkét pozícióban szubsztitúciót hajtunk végre, a natív hormonnál aktívabb és elnyújtott hatással rendelkező GnRH-I analógokhoz juthatunk<sup>80, 87, 88</sup>. A GnRH-I szekvenciájának 1, 2, 3, alkalmanként 5 és 10-es pozíciójában történő változtatással erős antagonistá tulajdonságú származékokat kapunk<sup>87-89</sup>, melyek gátolják az LH és FSH felszabadulást a hipofízisből a natív GnRH-I kötődésének gátlása folytán, ezáltal szteroid mentes állapotot hoznak létre.

Megfigyelték továbbá azt is, hogy ha egy GnRH-I antagonistá származék hatos pozíciójában lévő glicinjét is lecserélik (*D*-aminosav beépítésével), fokozottabb antagonistá tulajdonságú analóghoz jutunk<sup>80, 88, 90</sup>. Ezért potenciálisan alkalmazhatók hormonfüggő daganatok, úgy mint prosztata- és emlőtumorok esetében<sup>87, 91</sup>.

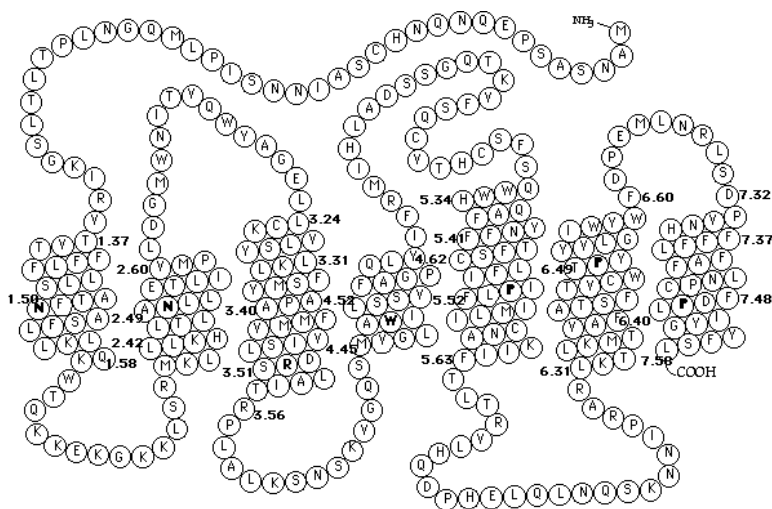


6. ábra: A GnRH-I analógok agonista és antagonistá tulajdonságát meghatározó régiói  
Eredeti ábra: Robert P. Millar (2003) *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 14, 35-43.

A hatos pozícióban lévő glicin *D*-aminosav csere okozta hatásnövekedés GnRH-II esetében nem figyelhető meg. Ez a csere gyakorlatilag nincs hatással a GnRH-II funkciójára<sup>70, 92, 93</sup>. A GnRH-II szekvenciáját alkotó aminosavak szerepe a receptorhoz való kötődésben, illetve aktivációban jól meghatározott, viszont a variábilis régióban található aminosavak szerepe, a GnRH-I-ével ellentétben, még nem tisztázott.

#### 1.4 Az emberben előforduló kéttípusú GnRH receptor (GnRH-IR és GnRH-IIR)

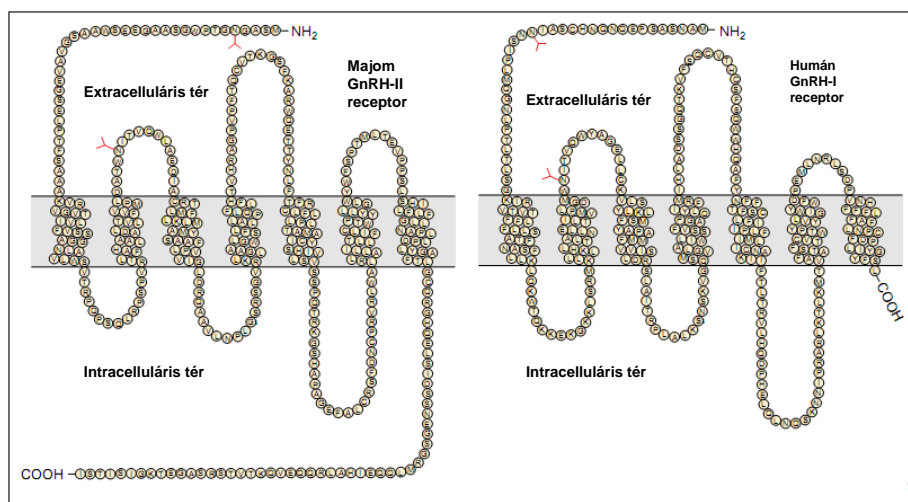
A GnRH peptidek hatásukat nagy affinitású G-protein kapcsolt receptorokon (GPCR) keresztül fejtik ki, melyek elsősorban a hipofízisben, illetve különböző perifériás szervekben fejeződnek ki<sup>94, 95</sup>. A GnRH-I receptor (GnRH-IR) a 7-transzmembrán G-protein kapcsolt receptor család egyik tagja<sup>96, 97</sup>. A receptorfehérje 329 aminosavból áll, és nem rendelkezik C-terminális citoplazmatikus szegmenssel<sup>98</sup> (7. ábra). Emiatt nem képes az arresztinhez kötődni, illetve arresztinen keresztül hatást kifejteni. Továbbá nem deszenzitizálódik (receptor érzékenysége nem valamilyen módon történő elvesztése ligandumával szemben), ugyanakkor a lassú internalizáció (az aktivált receptor-ligandum komplex endocitózisa) jellemző rá<sup>99, 100</sup>. Ezt a jól jellemzett GnRH-IR-t aktiválja a GnRH-I molekula, és az aktiváció következtében alakul ki az emlősök szaporodásának hipotalamikusan szabályozása.



7. ábra: A humán GnRH receptor

[http://physiology.med.cornell.edu/faculty/hweinstein/online/KK\\_poster.html](http://physiology.med.cornell.edu/faculty/hweinstein/online/KK_poster.html)

A két GnRH forma szekvenciáját tekintve 70%-os azonosságot mutat, mégis receptor fehérjéjüket eltérő gén kódolja. A GnRH-I és a GnRH-II receptorok alacsony homológiája egy korai génduplikációval magyarázható<sup>66</sup>.



8. ábra: A majom GnRH-II és a humán GnRH-I receptorok összehasonlítása  
Eredeti ábra: Jimmy D. Neill et al. (2004) *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 15,383-392.

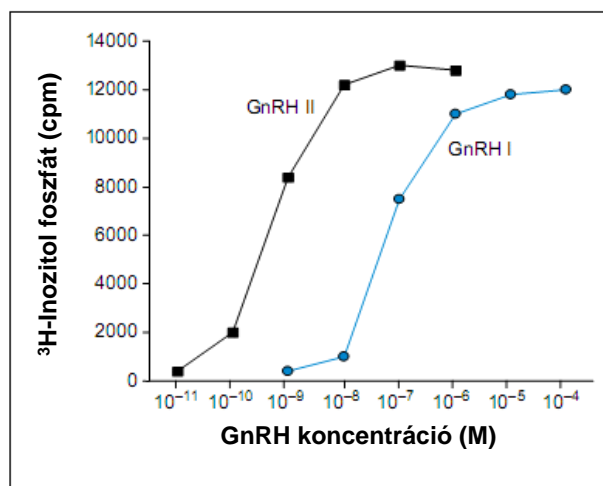
A GnRH-II nagyobb mértékben termelődik a perifériális szervekben (vese, csontvelő, prosztata), mint a GnRH-I, de az ezekben betöltött funkciója máig nem tisztázott<sup>63</sup>. A GnRH-II receptort számos fajban próbálták kimutatni, első ízben az afrikai harcsából tudták izolálni<sup>101</sup>. Legfőbb különbség a két receptor között a citoplazmatikus C-terminális részben van (8. ábra), amely minden GnRH-II receptor altípusban megtalálható, ezek hosszában van csupán eltérés a fajok között.

A citoplazmatikus C-terminális szegmensnek köszönhetően a GnRH-I receptorral ellentétben gyorsabban deszenzitizálódik, és az internalizációs képessége is fokozottabb<sup>100</sup>.

Mindkét GnRH forma (GnRH-I és GnRH-II) a  $G_{\alpha}$  alegységhez kapcsolódik és intracelluláris IP3 (inozitol triszfoszfát) felszabadulást vált ki. Ezt kihasználva Neill és munkatársai számos emlős fajból (pl. majom, sertés, egér) klónozták és szekvenálták a GnRH-II receptort kódoló gént, és az egyes fajokban található receptorok aktivitását meghatározták a felszabaduló IP3 segítségével.

Azt tapasztalták, hogy majmok esetében a receptor aktív és a ligandum (GnRH-II) nM-os koncentrációban képes aktiválni azt.

Meghatározták továbbá ugyanezen a rendszeren a GnRH-I IP3 felszabadító képességét is, mely a GnRH-II-höz képest 400-szor gyengébbnek bizonyult (9. ábra).



9. ábra: A GnRH-I és a GnRH-II IP3 felszabadító képességének meghatározása  
Eredeti ábra: Jimmy D. Neill et al. (2004) *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 15, 383-392.

A Neill és munkatársai által kapott adatok és más kutatócsoportok eredményei alapján elmondható, hogy a majomban található GnRH-II receptor és a GnRH-II között specifikus kölcsönhatás alakul ki, mely jóval nagyobb affinitású <sup>66,79</sup>, mint a GnRH-II receptor és GnRH-I között kialakuló kölcsönhatás <sup>66, 67, 79, 98</sup>.

A vizsgált fajok közül a majmon (a közlemény nem definiálta rendszertani szinten a vizsgált élőlényt) kívül sertésben találtak még GnRH-II receptort kódoló gént, mely a GPCR (7TM) családba tartozik és működőképes. Egérben, birkában, szarvasmarhában, illetve csimpánzban viszont nem találtak GnRH-II receptor gént. Egérben maga a GnRH-II sem termelődik <sup>63, 68-70, 78</sup>. A majom és sertés GnRH-II receptor 91%-ban homológ egymással<sup>98</sup>. Humán szervezetben eddig csak heréből tudták kimutatni a teljes GnRH-II receptort kódoló gént<sup>67</sup>.

Sertésben nemcsak a 7TM receptor fehérjét azonosították, hanem egy kisebb, 5TM doménből álló részt is, melyből hiányzik az első és második transzmembrán régió. Így az extracelluláris N-terminális közvetlenül kapcsolódik a harmadik transzmembrán részhez.

### 1.5 A GnRH receptorok szerepe a tumoros szövetek fiziológiájában

A GnRH-IR számos tumorsejten is megtalálható és feltehetően a GnRH-I analógok tumorelles hatásukat ezen keresztül fejtik ki<sup>98, 102</sup>. A tumorsejteken lévő GnRH-I receptorok mRNS szekvenciájuk és molekulatömegük alapján a hipofízisbeli GnRH-I receptornak feleltethetők meg, viszont ezek a tumorsejteken lévő receptorok más farmakológiai

tulajdonságokkal rendelkeznek, eltérő szignalizációt mutatnak. Kimutatták humán petefészek daganatokban a GnRH-IR fehérjéjével azonos mRNS szekvenciát, mely a hipofízisbeli GnRH-I receptornak feleltethető meg. A petefészek és endometrium daganatok 80%-ában megtalálható a GnRH-IR nagy affinitású kötőhelye<sup>103-105</sup>. A GnRH-IR jelenlétét kisebb mennyiségben kimutatták egészséges emlőszövetben is<sup>104</sup>.

A GnRH-I analógok fő hatásmechanizmusa a reproduktív szervek tumorsejtjein indirekt módon érvényesül a szteroid típusú nemi hormonok szintjének csökkentésével<sup>94, 95, 106, 107</sup>. Ugyanakkor számos humán tumorsejt típuson direkt antiproliferatív hatást váltottak ki GnRH-I analógok, melyek alapján feltételezni lehetett GnRH-I receptorok jelenlétét a tumorsejtek ezen típusain. Az a tény, hogy a GnRH-I analógok és citosztatikus származékaik képesek daganatsejtek proliferációjának gátlására a daganatsejtek felszínén található receptorokon keresztül, a hipofízisen kívül található GnRH-I receptorok felé irányította a figyelmet. A GnRH-I analógok direkt antiproliferatív hatása felhasználható terápiás célokra a GnRH-I receptorral rendelkező daganatok kezelésében<sup>94, 95, 99, 106, 107, 108-112</sup>.

A GnRH-I receptor nagy affinitású (specifikus) GnRH-I kötőhelyét először emlő-, majd endometrium-, petefészek- és prosztata daganatokon írtak le<sup>103, 113-117</sup>. Később ezekben a daganattípusokban GnRH-I receptor fehérje mRNS-ének kifejeződését is igazolták<sup>13, 103, 117-119</sup>. Humán emlődaganatok mintegy 50-64%-a GnRH-I receptor pozitivitást mutat<sup>116, 117, 120</sup>, valamint a receptor mRNS-e kimutatható a tumoros részzel határos normál emlőszövetben is<sup>121</sup>. A receptorfehérje és mRNS-ének kifejeződését kimutatták androgénfüggő (LNCaP) és androgénfüggetlen (DU 145) prosztata tumorsejtvonalakon<sup>122</sup>. Mára számos tumorsejtvonalat megvizsgáltak receptor pozitívitas szempontjából, így nem csak a reproduktív (emlő, endometrium, petefészek, prosztata), hanem más szervek tumoros sejtjein is kimutattak GnRH-I receptorokat, például száj-, gége-, vese-, agy-, hasnyálmirigy-, máj-, vastagbél daganatok, továbbá melanómák és non-Hodgkin limfóma esetében is<sup>13</sup>.

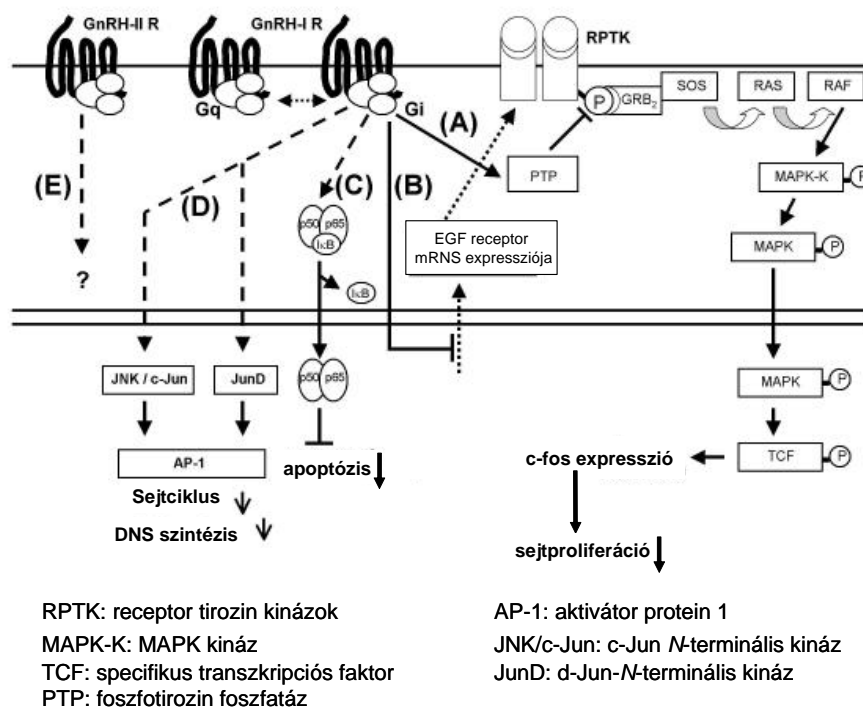
Tumorsejtekben a GnRH-I receptorok génjének kifejeződése, illetve a sejtfelszíni GnRH kötőhelyek száma is alacsonyabb, mint a hipofízisben, mégis a GnRH-I receptorok hatékonyan képesek közvetíteni a GnRH-I analógok sejtproliferációt gátló hatását. Ennek egyik magyarázata a GnRH-I receptorok lassú internalizációja, valamint a deszenzitizáció hiánya<sup>100</sup> (7. ábra). Ezért lehetséges, hogy a GnRH-I receptorok hosszabb ideig képesek aktív formában a sejtfelszínen maradni, mint általában a GPCR-ok. Az is tény, hogy a G-protein kapcsolt receptorhoz való kötődés függ a GnRH-I koncentrációtól, ugyanis a GnRH-I analógok  $\mu\text{M}$ -os koncentráció tartományban kötődnek a receptorhoz és fejtik ki proliferációgátló hatásukat különböző hatásmechanizmusok beindítása révén<sup>123</sup>. A



tumorsejtekkel ellentétben az egészséges szövetek többsége nem, vagy pl. a reproduktív szervek (egészséges prosztata, here és petefészek) sejtjei csak kis mennyiségben fejeznek ki GnRH-I receptorokat felszínükön<sup>124, 125</sup>. Az ivarmirigyek többsége nemcsak a GnRH-I receptort, hanem a GnRH-IIR-t is kifejezi, ily módon, együttesen játszanak szerepet a nemi hormonok termelésének/hatásának szabályozásában. A GnRH receptorok számbeli és esetenként minőségbeli különbsége teszi a GnRH receptorokat egyértelmű célponttá az irányított tumorterápiában<sup>100, 126-128</sup>.

## 1.6 A GnRH-I receptor jelátviteli útvonalai

A GnRH-I receptor által közvetített szignáltranszdukciós mechanizmus tumorsejtspecifikus, és eltér a klasszikus hipofízisbeli jelátviteli útvonaltól<sup>129</sup>. A hipofízisben a receptor a G-protein  $\alpha_q$  alegységéhez kapcsolódik, és aktiválja a foszfolipáz C (PLC), protein kináz C (PKC), és adenil cikláz (AC) kaszkádot<sup>105</sup>. A tumorsejtekben a receptor a G-fehérje többi alegységéhez kapcsolódik és antiproliferatív jelátviteli útvonalakat indukál a pertusszisz toxin (PTX)-szenzitív G protein  $\alpha_i$  alegységén keresztül (10. ábra).



10. ábra: A GnRH-I receptor jelátviteli útvonalai

Eredeti ábra: Gründker and Emons *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003 1:65

A GnRH-I analógok kötődése a tumorsejteken lévő GnRH-I receptorhoz számos intracelluláris folyamatot indíthat el. Ezek a receptorok képesek kapcsolatot teremteni a

növekedési faktorok, mint az epidermális növekedési faktor (EGF) és az inzulin-típusú növekedési faktor-1 (IGF-1) receptorainak szignáltranszdukciós útvonalaival<sup>129, 130, 131, 132, 133</sup>. Számos tumorsejt típus (proszta, emlő, hasnyálmirigy, petefészek, endometrium, vastagbél és agy tumorsejtvonalak) felszínén a fent említett növekedési faktorok receptorait is kimutatták a GnRH-I receptorok jelenléte mellett<sup>87, 91, 134-136</sup>. A receptorok és a jelátviteli útvonalak kapcsolatát támasztották alá azok az eredmények is, amelyek szerint a GnRH-I receptor pozitív humán emlő daganatsejteken a GnRH-I analógok sejtproliferáció gátló hatást fejtenek ki a növekedési faktorokon (ösztadiol (E2), EGF, illetve IGF-1) keresztül<sup>137-140</sup>.

### **1.7 Antiproliferatív hatás kifejtése GnRH-II receptoron keresztül**

A GnRH-II pontos jelátviteli mechanizmusa máig nem ismert. Még az is tisztázatlan, hogy a GnRH-I receptor képes-e közvetíteni, a GnRH-I és a GnRH-II hatását is. A GnRH-I agonista Antide és GnRH-I, vagy Antide és GnRH-II együttes alkalmazása ovárium daganatsejteken meggátolta a GnRH-I, illetve a GnRH-II indukált sejtproliferációt<sup>141</sup>. Ezek a megfigyelések vezettek ahhoz a megállapításhoz, hogy a GnRH-IR mind a GnRH-I, mind pedig a GnRH-II antiproliferatív hatását képes közvetíteni. Egy másik hipotézist is feltételeznek az antiproliferatív hatás mechanizmusára, miszerint a GnRH-II hatása egy különálló, GnRH-II-re specifikus receptor által közvetített. Ezt az állításukat arra alapozzák, hogy GnRH-IR génjétől megfosztott (GnRH-IR „knock-out”) endometrium- és petefészek daganatsejtek esetében a GnRH-I agonista triptorelin antiproliferatív hatása megszűnt, míg a GnRH-I antagonistá Cetrorelix és a GnRH-II növekedésgátló hatása megmaradt<sup>102</sup>. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy ovárium daganatsejteken a GnRH-I antagonisták és a GnRH-II antiproliferatív hatásukat nem a GnRH-I receptoron keresztül fejtik ki<sup>142</sup>.

Számos közlemény számol be a GnRH-II tumorsejtnövekedést gátló hatásáról<sup>75, 76, 103, 127, 128, 142-149</sup>, amelyek közül csak néhány tesz különbséget a GnRH-I, illetve GnRH-II receptoron kifejtett GnRH-II hatás között. Humán endometrium- és ovárium tumorsejtvonalakon a GnRH-II és agonista származékai szignifikánsan nagyobb sejtproliferációt gátló hatást eredményeznek, mint a GnRH-I agonisták<sup>102, 146, 150</sup>. A GnRH-II analógok antiproliferatív hatásukat, hasonlóan a GnRH-I analógokhoz, a növekedési faktorok indukált jelátvitelen keresztül is kifejezhetik<sup>151</sup>. A GnRH-I analógok és a GnRH-II kölcsönhatnak az EGF-indukált szignáltranszdukciós útvonalakkal. Mind a GnRH-I analóg [*D*-Trp<sup>6</sup>]GnRH-I (triptorelin) és a GnRH-II analóg [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II antiproliferatív hatása ismeretes GnRH-IR-t és feltételezett GnRH-IIR-t kifejező humán emlő daganatsejteken.

A GnRH-I és GnRH-II agonista, illetve antagonisták származékai GnRH-II receptoron keresztül közvetített antiproliferatív hatásának pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Mind a GnRH-I, mind pedig a GnRH-II fontos szerepet játszik a sejtproliferáció szabályozásában<sup>152</sup>. A GnRH-I és a specifikus GnRH-II receptorok jelenléte daganatsejteken, szöveteken új molekuláris célpontokat jelentenek a GnRH analógok klinikai onkológiai alkalmazásában. Kísérleti eredmények igazolják, hogy a GnRH-I és GnRH-II agonista, illetve antagonisták egyaránt képesek kötődni receptoraikhoz és jelentős sejtproliferáció gátlást eredményeznek, valamint a tumorok metasztatikus képességét csökkentik. A GnRH-I és GnRH-II analógok receptorhoz való kötődésük által indukált kölcsönhatások, jelátviteli útvonalak vizsgálata, megértése képessé teheti a kutatókat új, tumorszelektív vegyületek kifejlesztésére.

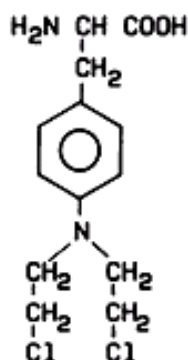
### **1.8 A célzott sejtbemutató GnRH analógok alkalmazásával - történeti áttekintés**

A GnRH analógok klinikai vizsgálata azt mutatta, hogy a tumornövekedés gátlása a gyógyulási időszakban korlátozott, mivel a hormonkezelés nem akadályozza meg a hormonfüggetlen daganatok esetében a daganatnövekedést<sup>153</sup>. A kemoterápia és a hormonterápia kombinációjával növelhető a gyógyszeres kezelés hatékonysága, ezáltal a túlélési arány<sup>154</sup>. Ha a hatóanyag molekulát nem csupán összekeverték a hormon molekulával, hanem kovalens kapcsolatot létesítettek közöttük, akkor még magasabb tumorelles hatást és szelektivitást értek el<sup>154</sup>.

A GnRH származékokon alapuló célzott kemoterápia onkológiai stratégiáját A. V. Schally laboratóriumában számos magyar kutató közreműködésével dolgozták ki. Ezek az analógok kétféle hatás kifejtésére alkalmasak. Egyrészt az önmagukban tumorelles hatással rendelkező GnRH származékok tumorsejtek felszínén lévő GnRH receptorhoz képesek kötődni, így a szintetikusan előállított analóg célzó- és tumorelles ágens egyben. Másrészt a GnRH származékhoz (célzó- és tumorelles ágens) citosztatikum kapcsolásával fokozottabb tumorelles hatású vegyület állítható elő. Az általuk előállított konjugátumok megnövelték a hatóanyag molekula szelektivitását és a terápiás hatékonyságot a citosztatikus vegyület tumorelles hatásának megtartása, illetve néhány esetben fokozása mellett, valamint csökkentették azok perifériális toxicitását<sup>155</sup>. A Schally-ék által kidolgozott elmélet azon alapult, hogy számos tumorsejt rendelkezik nagy affinitású GnRH-kötőhellyel. Ezzel ellentétben a normál szövetek csak korlátozott számban tartalmazzák ezt a kötőhelyet, ezért a citotoxikus ágens tartalmazó GnRH konjugátumok főleg a tumoros sejtekhez kötődnek, elkerülve ezáltal a citotoxikus ágensek általános alkalmazásakor fellépő mellékhatásokat<sup>13</sup>.

### 1.8.1 A GnRH analógok melfalánnal alkotott konjugátumai

Az első GnRH-I-et és hatóanyagot tartalmazó vegyületet *Bajusz és munkatársai* állították elő, amely *D*-melfalánt (*D*-Mel; 4-[bisz(2-klóretil)amino]-fenilalanin) tartalmazó molekula volt<sup>156</sup>. A nitrogén mustárok csoportjába tartozó melfalánt (11. ábra), vagy magába a GnRH-I molekulába – a hatos pozícióban lévő glicin helyére –, vagy pedig más GnRH-I antagonistá szarmazékokba építették be.



11. ábra: A *D*-melfalán szerkezete

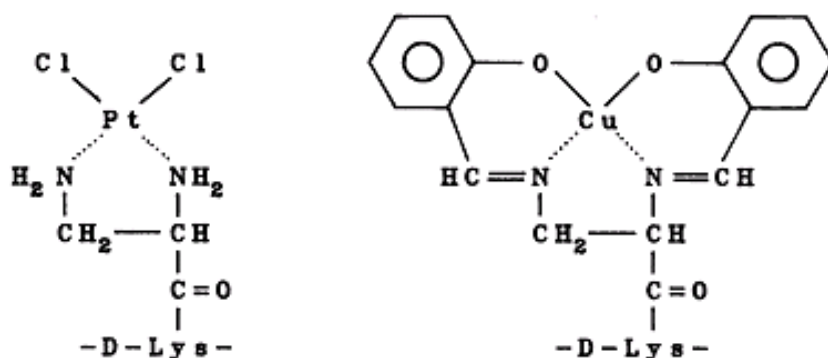
Mivel a tapasztalatok szerint a Gly<sup>6</sup> *D*-aminosavakkal történő cseréje (*D*-Lys vagy *D*-Trp) jóval hatásosabb GnRH-I agonista szarmazékokat eredményezett<sup>155, 157</sup>, célszerűnek tűnt a *D*-Mel-t is ebbe a pozícióba beépíteni. A *D*-Mel<sup>6</sup> szubsztitúció GnRH-I vagy GnRH-I antagonistá szarmazékok esetén alkilező tulajdonságú analógokat eredményezett, melyek fokozottabb agonista, illetve antagonistá tulajdonsággal rendelkeztek, és mind patkány hipofízis, mind pedig humán emlő tumorsejtek membránjában található GnRH-I receptorhoz nagy affinitással kötődtek. Noha ennek a vegyületcsaládnak a tagjai igen hatékony tumorelles hatást mutattak, a hormonhatás jelentős megnövekedése miatt nem kerültek alkalmazásra a tumorterápiában. A [*D*-Mel<sup>6</sup>]GnRH-I 130-szorosára emelte az LH-szekréciót a GnRH-I-hez képest, míg az antagonistá szarmazékok a nőstény patkányok ovulációját gátolták.

### 1.8.2 A GnRH-I metallopeptid szarmazékai

Schally kutatócsoportjában szintén magyar kutatók részvételével nagy hatékonyságú GnRH-I metallopeptid analógokat állítottak elő, amelyeket kombinált kemo- és sugárterápiára fejlesztettek ki.

Ezek a molekulák citotoxikus fémkomplexeket, pl. a ciszplatin [*cisz*-diaminodiklórpaltina(II)]<sup>158</sup>, vagy a *transz*-bisz(szalicilaldoxim)réz(II)<sup>159</sup> vegyületet tartalmaznak, melyek a [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I vagy GnRH-I antagonistá szarmazékok lizin

oldalláncához egy kapcsolóstruktúrán keresztül kapcsolódtak, ily módon agonista, illetve antagonistá tulajdonságú vegyületek jöttek létre (12. ábra)<sup>160</sup>.



12. ábra: A GnRH metalloprotein analógok szerkezete

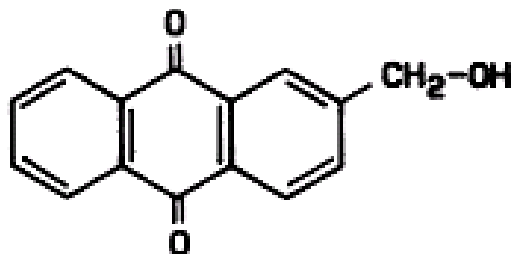
A [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I származék előállításakor Boc-D-Lys(Z<sub>2</sub>A<sub>2</sub>pr) vagy Boc-D-Lys(Z<sub>2</sub>A<sub>2</sub>bu) (ahol, az A<sub>2</sub>pr és az A<sub>2</sub>bu: 2,3-diaminopropionsav, illetve 2,4-diaminobutánsav) analógot építettek be a GnRH-I molekula hatos pozíciójába. Az így előállított GnRH-I származék a Z-védőcsoport eltávolítása után képes közvetlen kelátképzésre a két aminocsoportján keresztül platina-kloriddal (PtCl<sub>2</sub>). A réz származékok előállításakor a GnRH-I származék szalicilaldehid (Sal) felhasználásával Schiff-bázissá alakítható, amely már képes kelátképzésre réz(II) ionokkal. Ezek a metalloprotein analógok (agonista és antagonistá származékok egyaránt) jelentős citotoxikus aktivitást mutattak T-47D humán emlődaganat, illetve PC-3 humán prosztata adenokarcinóma sejtvonalakon. A citotoxikus tulajdonság mellett ezek a vegyületek is jelentős endokrin hatással rendelkeztek. Az agonisták által kiváltott LH-szekréció 25-55-szöröse volt a natív GnRH-I molekuláénak, míg a GnRH-I antagonistá származékok teljes mértékben gátolták az ovulációt<sup>160</sup>.

### 1.8.3 Citosztatikumot tartalmazó GnRH-I származékok

Janáky és munkatársai előállítottak egy GnRH-I-hatóanyag konjugátum sorozatot, amely különböző kémiai szerkezetű citosztatikus/ citotoxikus tulajdonsággal rendelkező (D-melfalán, reaktív ciklopropán, antrakinon analóg, doxorubicin (Dox), metotrexát (Mtx)) vegyületet tartalmazott hatóanyagként.

A komponenseket a megfelelően módosított GnRH-I agonista és antagonistá származékokhoz kapcsolták<sup>161</sup>. A GnRH-I analógok, melyekbe D-Lys<sup>6</sup> vagy D-Orn<sup>6</sup>, illetve D-Lys(A<sub>2</sub>pr)<sup>6</sup> és D-Orn(A<sub>2</sub>pr)<sup>6</sup> aminosavszármazékokat építettek be, hordozó molekulákként szerepeltek, amelyek a módosításnak köszönhetően képesek egy vagy két citotoxikus ágens

magukhoz kötve szállítani. Elsőként a 2-(hidroximetil)antrakinon (13. ábra) glutársavval (HMAQG (glutaril-2-(hidroximetil)antrakinon)) alkotott észterét használták fel a GnRH-I agonista és antagonisták származékainak előállítására.



13. ábra: A HMAQ szerkezete

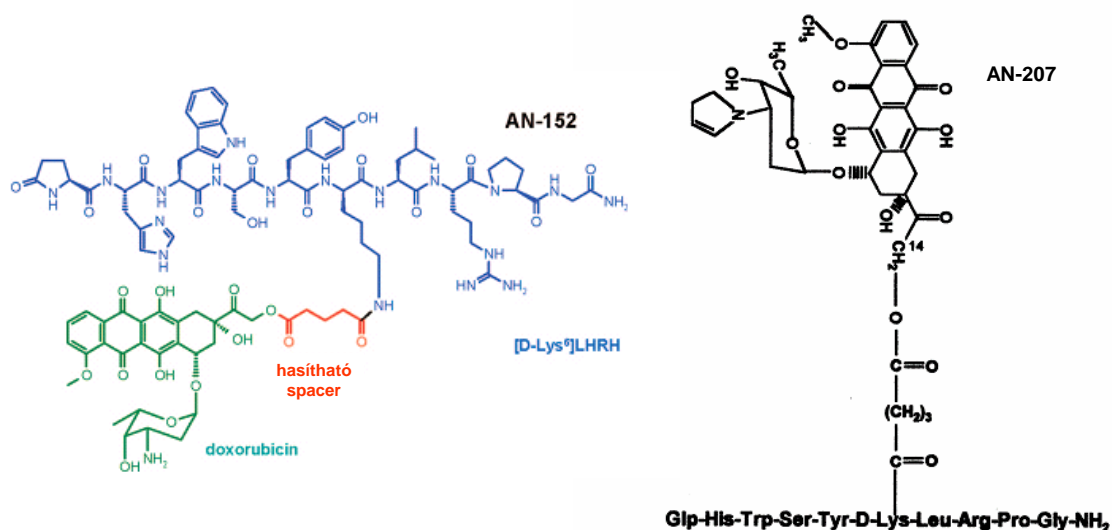
Az agonista származékok receptorhoz való kötődési képessége igen alacsony volt. Ezzel ellentétben az antagonisták származékai 2-10-szer magasabb affinitással kötődtek a receptorhoz, mint maga az antrakinont nem tartalmazó hormon analóg. Az extrém magas és hosszantartó antagonisták hatása azzal magyarázható, hogy a konjugátumok lassan disszociálnak a receptor kötőhelyéről. A HMAQ-t tartalmazó észterkötésű konjugátumok tumorellenes hatása megközelítette a szabad hatóanyagét (HMAQ). Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a konjugátumból a hatóanyag könnyen felszabadul az észterkötés hasadásával. Ezen eredmények és a korábbi munkák<sup>91, 156, 160</sup> azt mutatták, hogy a GnRH-I analógok hordozóként szolgálhatnak kemoterápiás ágensek számára, hiszen a konjugátumok képesek kötődni a tumorsejtek membránjában található receptorokhoz. Ezt a kötődést internalizáció követi és a konjugátum által kiváltott események láncolatának eredményeként a neoplasztikus sejtek replikációja megváltozik vagy citotoxikus ágensek okozta sejtkárosítás jön létre.

A doxorubicin tartalmú konjugátumok esetében viszont nem tapasztaltak az antrakinon származékhoz hasonló tumorellenes hatást. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy a hatóanyagot a daunózamin rész aminocsoportján keresztül amidkötéssel kapcsolták a hatos pozícióban *D*-lizint tartalmazó GnRH-I analóghoz. Ily módon első lépésben a *D*-lizint tartalmazó GnRH-I molekulát a lizin oldalláncán glutársav-anhidriddé, majd a módosított oldalláncot *in situ* aktív észterre alakították, és amidkötés kialakítása közben doxorubicinhez kapcsolták. Az így előállított konjugátum nem mutatott jelentős tumorellenes hatást. Ami azzal magyarázható, hogy a hatóanyag és a peptid között kevésbé hasítható amidkötés volt, ezáltal a hatóanyag nem, vagy csak alig tudott felszabadulni a konjugátumból. Ezért a későbbiekben a doxorubicin kapcsolását GnRH-I származékokhoz hasonlóképpen valósították

meg, mint a HMAQ konjugálását. Ennek alapján a hatóanyagot funkcionáliszták glutársav-anhidriddel és azt kapcsolták a  $[D\text{-Lys}^6]\text{GnRH-I}$  származékhoz észterkötéssel. Az így előállított citotoxikus GnRH-I agonista konjugátum 15-56-szor magasabb LH-szekretáló képességgel rendelkezett, és 2-8-szor hatékonyabb volt antiproliferatív hatás szempontjából, mint maga a GnRH-I. Amennyiben GnRH-I antagonistához kapcsolták a hatóanyag molekulát, az LH-szekrécióra kifejtett gátló hatás megnövekedett. Ha ugyanezt a hatóanyag molekulát kapcsolták  $[D\text{-Orn}^6]\text{GnRH-I}$  analóghoz, nem pedig  $[D\text{-Lys}^6]\text{GnRH-I}$ -hez, akkor csökkent vagy teljesen elveszett a GnRH-I receptorhoz való kötődési képesség emlő tumorsejteken. A  $[H^3]$ timidin beépülés gátlásán alapuló citotoxikus vizsgálatok alapján elmondható, hogy minden vegyület hatásos volt *in vitro*, de a konjugátumok által kiváltott válasz sejtvonalfüggőnek bizonyult<sup>161</sup>.

### 1.8.3.1 A GnRH-I AN-152 és AN-207 analógjai

Schally és munkatársai az 1990-es évek közepén új citotoxikus GnRH analógok sorát állították elő.



14. ábra: Az AN-152 és az AN-207 szerkezete

Eredeti ábra: Jörg B. Engel és munkatársai *Mol. Pharmaceutics*, 2007, 4 (5), 652-658 (AN-152) és Nagy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996), 93, 7269-7273. (AN-207)

Ezekben az analógokban a doxorubicint (Dox), illetve annak jelentősebb tumorellenes hatást mutató származékát, a 2-pirrolino-Doxorubicint (AN-201) (*in vitro* 500-1000 szerez aktivitással rendelkezik, mint maga a Dox, de a hatás tumorsejtfüggő) konjugálták a  $[D\text{-Lys}^6]\text{GnRH-I}$  agonista (AN-152, illetve AN-207) (14. ábra), vagy pedig az antagonistá (Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>) származékhoz<sup>162-164</sup>.

A hatóanyag 14-*O*-hemiglutarát származékát kapcsolták a GnRH-I analóghoz, *D*-Lys<sup>6</sup> oldalláncán keresztül. Így a hatóanyag lényegében észterkötéssel kapcsolódik a peptidlánchoz. Az így előállított AN-152 (Dox) és AN-207 (2-pirrolino-Dox) konjugátumok antitumor hatását vizsgálták *in vitro* és *in vivo* különböző tumorsejtvonalakon (pl. emlő, petefészek, endometrium, prosztata daganatok, non-Hodgkin limfóma, melanóma és vastagbél<sup>13, 53, 108, 110, 165, 166</sup>). A vegyületek hatékonysága erősen függ a daganatsejtek típusától, ugyanis a különböző daganatsejtek eltérő mértékben fejezik ki a GnRH-I receptorokat. A legtöbb daganattípus esetében az AN-207, mely a hatékonyabb doxorubicin származékot tartalmazza (2-pirrolino-Dox) fokozottabb tumorelles hatással rendelkezett, mint az AN-152.

Ismeretes, hogy a doxorubicin képes biomembránokkal kölcsönhatásba lépni, és a membránok normál biokémiai funkcióit megváltoztatni anélkül, hogy a sejtekbe bejutna<sup>167, 168</sup>. Az AN-152 és AN-207 GnRH-I konjugátumok *D*-lizint tartalmaznak a hatos pozícióban, és *Bajusz és munkatársai* kimutatták, hogy a hatos pozícióban szubsztituált analógok képesek a gonadotróp sejtekhez kötődni<sup>156</sup>. Ezért *ex vivo* kísérletben meghatározták ezen hatékony származékok hipofízisre kifejtett hatását (károsodás mértékét és fokát) a tolerálható dózisban. Azt tapasztalták, hogy az AN-207 szelektív károsodást okozott a hipofízis gonadotróp sejtjeinek funkciójában a kezelést követő egy héten belül (53%-kal csökkent a receptor-mediált, és 52%-kal csökkent a K<sup>+</sup>-indukált LH-felszabadulás mértéke). Az AN-201 (2-pirrolino-Dox) által okozott károsodás a konjugátumhoz hasonlóan reverzibilisnek bizonyult, de ez utóbbi nem szelektív, átmeneti, és visszafordítható, ugyanis a kezelést követő 2-3 héten belül visszaállt a gonadotróp sejtek normál funkciója. Mindezek ellenére az AN-152 konjugátumot tesztelik preklinikai és klinikai vizsgálatokban, mert a doxorubicin ellentétben a 2-pirrolino-doxorubicinnal a gyógyászatban alkalmazott, farmakológiailag jól jellemzett hatóanyag, így annak és metabolitjainak vizsgálata nem igényel külön eljárást.

A klinikai vizsgálatok alapjául számos *in vitro* kísérlet közül a specifikus receptor-liganum kötődés szolgált. A konjugátumból a hatóanyag a feltételezhetően karboxiészteráz enzim (CE) hatására szabadul fel a tumorsejtekben. Ennek vizsgálatára „nude” egerek (*in vivo* laboratóriumi kísérletekhez tenyésztett szőrtelen egértörzs) szérumát tanulmányozták, melyben az enzimaktivitás az emberi széruménak tízszerese<sup>169</sup>. A magasabb CE aktivitás eredményeként a konjugátum gyorsabban bomlott el eger szérumban, mint humán szérumban, és alacsonyabb volt a konjugátum tolerálható mennyisége<sup>170</sup>. Több *in vivo* kísérletben Carioxánt is használtak azért, hogy az így szabaddá váló doxorubicin szívizomsejtekre



gyakorolt toxikus hatását ellensúlyozzák<sup>125, 171-173</sup>. Az AN-152 konjugátum vizsgálata pillanatnyilag ovárium és endometrium tumorokon klinika III fázisban van.

#### 1.8.4 *N*-terminális felől rövidített GnRH-I származékok

Noha a GnRH-I agonista és antagonisták analógjainak irodalma bő (több mint 2500 agonista és antagonisták GnRH-I analógot állítottak elő), mindössze néhány közlemény számolt be rövidített GnRH-I származékok szintéziséről. A GnRH-I származékok *N*- vagy *C*-terminális aminosavainak eltávolítása drámai csökkenést eredményezett az endokrin hatásban<sup>174</sup>. Első ízben 1974-ben *Rivier és munkatársai* állítottak elő rövid láncú analógokat annak érdekében, hogy megtalálják a legkisebb, még biológiailag aktív fragmentumot. Két sorozatot állítottak elő: az egyik sorozatot az *N*-terminális felől, a másikat a *C*-terminális felől rövidített szekvenciával rendelkező peptidek alkották. Mindkét sorozat tagjai csekély aktivitással rendelkeztek<sup>174, 175</sup>. Amennyiben a *C*-terminálison lévő glicint amidált formában állították elő, a natív GnRH-I-nél jóval hatásosabb származékot kaptak<sup>176, 177</sup>.

*König és munkatársai* az egyik GnRH-I analóg, a gyógyszerként is alkalmazott szuperagonista buserelin (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-*D*-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Leu-Arg-Pro-EA) fragmentum peptideit vizsgálták, s azt találták, hogy a buserelin(3-9) a legkisebb fragmentum, mely még szignifikáns ovulációs hatást képes kiváltani<sup>178</sup>.

*Haviv és munkatársai* számos GnRH-I-ből származó hexapeptid analógot állítottak elő és tesztelték receptorhoz való kötődési képesség meghatározása céljából. Azt találták, hogy az egyes hexapeptid fragmentumok receptorhoz való affinitása igen eltérő volt. A receptorhoz való affinitást, valamint a biológiai választ (agonista vagy antagonisták) a négyes és hatos pozícióban lévő szubsztitúció határozta meg. Vizsgálataik azt mutatták, hogy a GnRH-I(4-9) analógok endokrin rendellenességekben alkalmazható vegyületek lehetnek<sup>179</sup>.

*Janáky és munkatársai* az *N*-terminálison rövidített GnRH-I peptideket állítottak elő; Ac-GnRH-I(3-9)-EA és Ac-GnRH-I(4-9)-EA, melyek a hatos pozícióban *D*-Lys vagy *D*-Orn aminosavat tartalmaztak. A peptidek *C*-terminálisát amidálták etilaminnal, az *N*-terminálisát pedig acetilezték<sup>180</sup>. Ezek a rövidített szekvenciával rendelkező peptidek, valamint citotoxikus származékaik, melyek *D*-Mel, Dox, Mtx, HMAQG az előzőekhez hasonlóan konjugálva a GnRH-I analógokhoz, illetve cisplatinszerű platina komplexet tartalmaztak, nem mutattak GnRH-I agonista tulajdonságot sem *in vitro*, sem pedig *in vivo*. A peptid fragmentumok nem rendelkeztek *in vivo* LH-szekréciónak hatással még a natív GnRH-I LH-szekrétáló dózisának ezerszeres mennyiségében sem. Ezek a rövidített szekvenciájú GnRH-I származékok nem rendelkeznek hormonfüggő tumorellenes hatással, mégis gátolják a [<sup>3</sup>H]timidin beépülését. A

hatást azzal próbálták magyarázni, hogy számos tumorsejt valószínűleg GnRH-I típusú peptideket termel, melyek lokálisan növekedési faktorként működnek és a rövidlancú GnRH-I fragmens peptidek gátolják ezeket a GnRH-I típusú peptideket<sup>117, 134, 181</sup>. Ezen eredmények alapján nem valószínű, hogy a rövidített peptidek képesek gátolni a hipofízis-gonád rendszert, ezáltal a szteroid típusú nemi hormontermelést<sup>181</sup>. Ugyanakkor a citosztatikumokat tartalmazó vegyületek tumorelles hatást mutattak, tehát a rövidített szekvenciák alkalmasak lehetnek hatóanyag szállítására.

### 1.9 A GnRH-III peptid

A GnRH harmadik izoformája, melyet a nagy tengeri ingolából izoláltak (*Petromyzon marinus*), új lehetőségeket adott a GnRH származékokat előnyben részesítő daganatterápiában<sup>182</sup>. A GnRH-III (IGnRH-III; pGlu-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, továbbiakban, a dolgozatban GnRH-III-ként jelölve) a szekvencia 5-8 aminosavaiban különbözik a humán GnRH-I-től, továbbá nem rendelkezik jelentős endokrin hatással emlősökben. Az LH-felszabadító képessége 500-1000-szer alacsonyabb, mint a humán GnRH-I hormonnak<sup>183-185</sup>. Ennek ellenére a GnRH-III felismeri mind az alacsony, mind pedig a nagy affinitású GnRH-I kötőhelyet a receptoron, és képes szignifikáns gátló hatást kifejteni különböző humán daganatok sejtproliferációjára. Ez a dekapeptid analóg  $\mu$ M-os koncentrációban koncentrációfüggő módon gátolja humán emlő-, prosztata-, hasnyálmirigy-, endometrium- és vastagbél tumorsejtek osztódását<sup>184, 186-190</sup>. A tumornövekedést gátló hatása specifikus és közvetlen, hiszen a GnRH-III nem rendelkezik endokrin hatással a sejtproliferációt gátló koncentrációban. A GnRH-III képes mind a GnRH-I, mind pedig a GnRH-II receptorhoz kötődni. Ennek mértéke a két GnRH receptoron körülbelül azonos<sup>191</sup> (1. táblázat). A GnRH-III specifikus kötődése a GnRH receptorokhoz és egyértelmű tumorelles hatása igazolt, mind szteroid receptor pozitív, mind pedig negatív tumorsejtvonalakon.

Az endokrin hatás hiánya mellett további előnye, hogy csak *L*-aminosavakat tartalmaz, ellentétben a többi tumorellenes hatású GnRH analóggal, ezáltal a többi analóg okozta ödémásodás elkerülhető<sup>192</sup>.

1. táblázat: A GnRH-III kötődési képessége GnRH-I, illetve GnRH-II receptorhoz

Kötődés	selyemmajom GnRH-IIR	humán GnRH-IR
GnRH-II	1	0,1*
GnRH-I	0,02*	1
GnRH-III	0,1*	0,1*

\* Az egyes GnRH peptidek GnRH-I, illetve a GnRH-II receptorhoz való kötődési képesség a saját ligandum receptorhoz való kötődési képességéhez(1) viszonyítva.

Eredeti táblázat: R. P. Millar, *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 14(1), 2003

A GnRH peptidek szerkezet-hatás összefüggés vizsgálata céljából számos GnRH-III származékot állítottak elő *Mező és munkatársai*<sup>187</sup>. Ezen származékok közül csak néhány mutatott hasonló tumorellenes hatást, mint a natív hormon (GnRH-III(1-9)-EA, [ $\epsilon$ -N-Ac-Lys<sup>4</sup>]-GnRH-III, és [ciklo(Asp<sup>6</sup>,Lys<sup>8</sup>)GnRH-III]), viszont hatásosabb származékot nem sikerült előállítani. Az indolgyűrű (Trp<sup>3,7</sup>) szerepét a tumorellenes hatás szempontjából igazolták, illetve megállapították, hogy az alábbi aminosav cserék nem megengedettek a tumorellenes hatás elvesztése nélkül: Gly<sup>10</sup> csere *D*-Ala, Glp<sup>1</sup> cseréje *Ac-D*-Trp, vagy His<sup>5</sup> - Lys cseréje.

*Herédy-Szabó és munkatársai* tanulmányozták a GnRH-III központi régiójának szerepét az emlőtumorok növekedésének gátlásában Ala-scan felhasználásával. Azt tapasztalták, hogy mind az Asp<sup>6</sup>, mind pedig a Trp<sup>7</sup> alaninra történő cseréje a GnRH-I receptorhoz való kötődés teljes elvesztését eredményezte MDA-MB-231 humán emlő tumorsejtvonalakon. A His<sup>5</sup> cseréje alaninra pedig a natív hormonnál gyengébb kötődést okozott, és az antiproliferatív hatás elvesztését eredményezte. A peptid 8. pozíciójában lévő Lys-Ala csere nem befolyásolta a kötődést és az analóg megtartotta sejtnövekedést gátló hatását  $\mu$ M-os koncentrációban<sup>189</sup>.

Egy másik kísérletsorozatban a GnRH család variábilis régiójára (5-8 pozíció) koncentrálna pozicionális scanning peptidkönyvtárat (positional scanning peptide library) hoztak létre. Az így előállított peptideket kompetitív kötődésvizsgálattal tanulmányozták, és hat új, hatékony analógot választottak ki a kötődési adatok alapján. A hatékony vegyületek közül egyetlen olyat találtak, mely a természetben is előfordul, ez a csirke GnRH-II-vel volt azonos. Azonban a szintetikus könyvtár egyetlen tagja sem volt hatásosabb a GnRH-III-nál<sup>190</sup>.

### 1.10 A GnRH dimerek

A természetben egyetlen diszulfidkötést tartalmazó GnRH dimer vegyület ismeretes, amely az előgerinchúrosok GnRH-II dimer típusú származéka. Ez a származék a 6. pozícióban ciszteint tartalmaz ( $[<EHWSLCHAPG-NH_2]_2$ ). A dimerizáció feltehetőleg növeli a peptid stabilitását, térbeli gátláson keresztül ellenállóbbá válik az enzimatis lebontással szemben. Valószínű, hogy a dimert alkotó mindkét monomer alegység kötődik a receptorhoz, ezáltal növeli a receptorok mikroaggregációját, komplex képződését, illetve azok internalizációját<sup>61, 108, 193</sup>. A GnRH dimerek elősegíthetik a GnRH receptorok keresztkötését, ezáltal fokozhatják a hormon-receptor komplex internalizációját.

A kutatócsoportban végzett korábbi kísérletekben olyan GnRH-III dimer származékokat állítottak elő, melyekben a 8. pozícióban lévő lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjához ciszteint kapcsolnak. A cisztein aminocsoportját szabadon hagyták, vagy acetilezték és a monomerek enyhén bázisos körülmények között dimerré oxidálódtak levegő jelenlétében ( $[<EHWSHDWK(H-C)PG-NH_2]_2$ ,  $[<EHWSHDWK(Ac-C)PG-NH_2]_2$ ), így a két molekulát diszulfidhíd köti össze<sup>194, 195</sup>. A sejtproliferációs vizsgálatok során ezek a dimer származékok MCF-7 humán emlő- és HT-29 humán vastagbél karcinóma sejtvonalakon hatásosabbnak bizonyultak, mint maga a GnRH-III. Az acetilcsoport jelenléte a cisztein *N*-terminálisán fokozottabb *in vitro* sejtproliferációt gátló hatást eredményezett.

## 2 A szilárdfázisú peptidszintézis elve és gyakorlati alkalmazása

A peptidek előállításának két típusát különböztetjük meg; a ma már ritkábban alkalmazott oldatban végzett és a szilárdfázisú peptidszintézist (SPPS).

Munkám során szilárdfázisú szintézist alkalmaztam a peptidek előállítására. A SPPS során a peptidet egy szilárd hordozón építjük fel, mely elméletének kidolgozása Merrifield nevéhez fűződik<sup>196</sup>. A szilárdfázisú peptidszintézisben két alap lépés ciklikus ismétléséről van szó; az első lépés a gyantához, mint szilárd hordozóhoz kapcsolt aminosav vagy peptid *N*-terminális védőcsoportjának lehasítása, míg a másik lépés egy, a *C*-terminálison aktivált aminosav kapcsolása a gyantához kötött vegyület szabad aminocsoportjához. A peptidkötés kialakításának ezt a típusát lépésenkénti, vagy stepwise módszernek nevezzük.

Az SPPS során az acilezőszerek alkalmazott nagy feleslege miatt elkerülhetetlen az oldalláncban funkciós csoportot tartalmazó aminosavak oldalláncának védelme, szemben az oldatban végzett szintézissel, ahol általában nem alkalmaznak ilyen reagens feleslegeket. A módszer egyik hátránya, hogy az egyes lépések között csak a reagens feleslegének mosással történő eltávolítására van mód, a melléktermékek (a gyantához kötött peptidláncon kialakuló hibás szekvenciák) eltávolítására, illetve izolálására nincs mód, csak a peptid gyantáról való lehasítását követően. Ezért szükséges, hogy a kapcsolási lépések nagy hatásfokkal, lehetőleg 100%-osan játszódjanak le. Ennek megfelelően az aminosav származékokból, valamint a kapcsoláshoz szükséges reagensekből gyantakapacitásra nézve általában 3-5 ekvivalensnyi mennyiségre van szükség. A szintézis végén a peptidet lehetőség szerint úgy kell eltávolítani a gyantáról, hogy azzal egy lépésben az oldallánc védőcsoportok is lehasadjanak.

A szilárdfázisú szintézisben két általánosan alkalmazott stratégiát különböztetünk meg:

- Boc/Bzl stratégia, melyben az aminosavak  $\alpha$ -aminocsoportját Boc védőcsoport (*tert*-butiloxikarbonil) védi<sup>197</sup>.
- Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia, melyben az  $\alpha$ -aminocsoport védelmét Fmoc védőcsoport (9-fluorenilmetoxikarbonil) látja el<sup>198, 199</sup>.

Mivel a Boc/Bzl stratégiában mind az átmeneti védőcsoport, mind pedig a végső hasítás savas közegben zajlik le. Ez az eljárás a savas közegben oxidációra és alkileződésre érzékeny aminosavakat tartalmazó peptidek esetén számos mellékterméket eredményezhet. Ilyen esetekben az Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia jobb megoldást nyújt, mivel az átmeneti

aminovédőcsoport bázisokkal (elsősorban szerves szekunder aminok) hasíthatók és a végső savas hasítás is enyhébb körülmények között valósítható meg.

A SPPS során a szilárd hordozó szerepét, amely egyben a C-terminális karboxilcsoport védelmére is szolgál, a gyanta tölti be, melynek az alábbi követelményeknek kell megfelelnie:

- Tartalmazzon funkcionálizálható reaktív részt.
- A kialakuló peptid-polimer kötés hatékonyan hasítható legyen a szintézis végén, ugyanakkor ne hasadjon le az átmeneti aminovédőcsoport eltávolításakor.
- Kémiaileg stabil legyen a szintézis körülményei között, illetve fizikai behatásokra (keverés) is ellenálló legyen.
- A növekvő peptidlánc jól hozzáférhető maradjon mind az oldószerek, mind pedig a reagensek számára, vagyis jól duzzadjon.

Mára már számos gyantatípust dolgoztak ki; ezek között vannak speciális gyanták is. A gyantát általában valamilyen térhálósítható polimer alkotja (pl. polisztirol és 1-2% 1,4-divinilbenzol, vagy 1,2-divinilbenzol kopolimerje), amelyhez kémiaileg kötött funkciós csoport kapcsolódik. A szintézisek során MBHA (4-metilbenzhidrilamin)<sup>200</sup> gyantát alkalmaztam, mely a Boc/Bzl stratégiában alkalmazott gyantatípus, és a peptidet C-terminálisán amidált formában kapjuk meg a peptid gyantáról történő hasítása után.

Munkám során a két stratégia együttes alkalmazásával építettem fel az általam tervezett GnRH peptideket MBHA gyantán. Ez a vegyes stratégia alkalmas viszonylag olcsón, elágazó láncú peptidek előállítására. Ebben az esetben a szintézis végén kétlépéses hasítási eljárást tudunk alkalmazni, melynek első lépésében a <sup>t</sup>Bu-típusú védőcsoportokat távolítjuk el TFA oldattal a megfelelő gyökfogók jelenlétében. Második lépésében a Boc/Bzl stratégia védőcsoportjait és a peptidet hasíthatjuk le a gyantáról HF segítségével. Ennek a módszernek további előnye, hogy a végső erős savas hasítás során minimális mennyiségben képződnek alkilezésre képes karbokationok, mivel a védőcsoportok többségét már az előző lépésben eltávolítottuk.

A szintézis során a peptidek funkcionálizálása is megvalósítható, hiszen számos kémiai ligációra alkalmas csoport, illetve aminosav bevitelére nyílik lehetőség. Így a szintézis során kapcsolható a peptidre oximkötés kialakítására alkalmas aminosav, tioéterkötés kialakítására képes klórecetsav. Továbbá cisztein beépítésével, diszulfidhíddal rendelkező szimmetrikus dimer származékok is előállíthatók.

### 3 Célkitűzések

Doktori munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

- Olyan új GnRH-III származékok szintézisét kívántam megvalósítani, amelyek fokozottabb tumorelles hatást mutatnak. A hatékonyság növelése érdekében
  - az önmagában is tumorelles hatással bíró természetes GnRH-III hormonból különböző dimer származékok előállítását,
  - valamint citosztatikumok GnRH-III molekulához való kapcsolását terveztem különböző kötéstípusok kialakításával.
- *N*-terminális felől rövidített GnRH-III fragmens peptidek szintézisét, fluoreszcens jelölését kívántam megvalósítani sejtbejutási képességük meghatározása céljából.
- Triciált natív GnRH molekulákat kívántam előállítani kötődésvizsgálat céljára.
- A peptidek és konjugátumok enzimstabilitásának vizsgálatát terveztük.
- A szintetikus előállított és analitikailag jellemzett (retenciós idő, molekulatömeg) dimer származékok és hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok *in vitro* hatásosságát kívántam vizsgálni különböző biológiai rendszereken.
  - Mivel a GnRH származékok jelentős endokrin hatással rendelkeznek, az LH-szekrécióra gyakorolt hatásuk vizsgálatát terveztem patkány hipofízis sejtek felhasználásával.
  - Az összes GnRH analóg esetében meg kívántam határozni a sejtbejutási képességüket MCF-7 humán emlő-, HT-29 humán - vagy C26 egér vastagbél tumorsejtvonalakon, továbbá kísérlettel kívántam igazolni a receptoron keresztül történő sejtbejutást.
  - A hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumokba olyan citosztatikumot kívántam beépíteni, mely képes a DNS-hez kötődni, gátolva a DNS replikációt. Fluoreszcencia spektroszkópiai módszerrel terveztem ellenőrizni, hogy a biokonjugátum képes-e kötődni a DNS-hez, megtartja-e a citosztatikum ezen tulajdonságát.
  - A hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok esetében azok citosztatikus hatását terveztem meghatározni MCF-7, HT-29 és C26 sejtvonalakon.
  - A dimerek esetében az antiproliferatív hatásukat kívántam vizsgálni MCF-7, HT-29, valamint T-47D humán emlő tumorsejtvonalakon.

- Az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján kiválasztva a leghatásosabb származékokat – dimer és hatóanyagot tartalmazó konjugátum esetén egyaránt - *in vivo* toxicitás és *in vivo* antitumor hatás vizsgálatát terveztem egér modelleken különböző humán és egér eredetű tumorsejtvonalak xenograftként történő alkalmazásával.

A célkitűzések pontjaiban foglaltakat a 15-16. ábra foglalja össze.

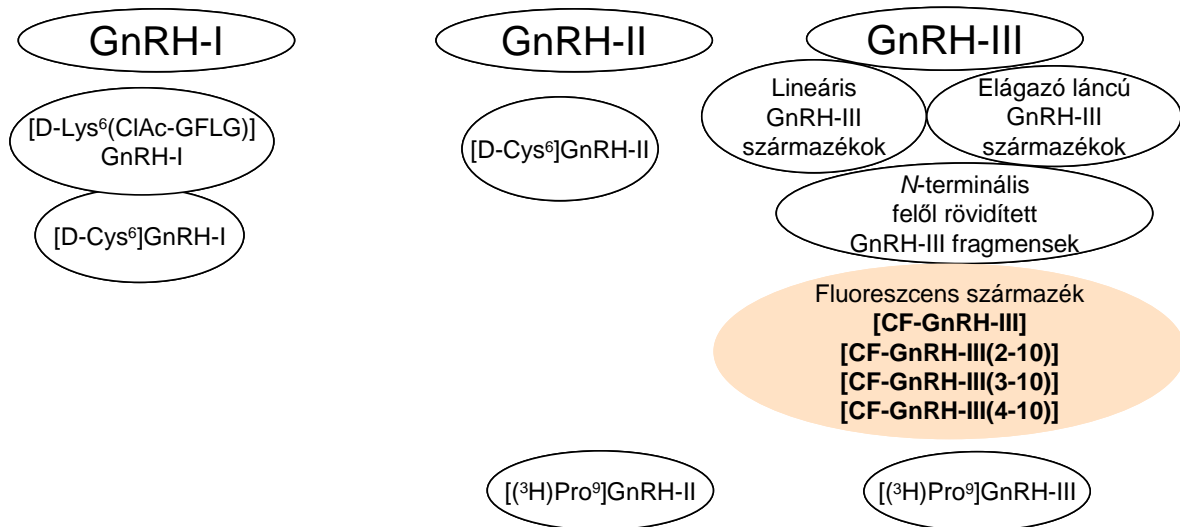
Az ábrában szereplő jelöléseket, rövidítéseket az alábbiakban foglalom össze az ábra könnyebb megértése miatt.

Ac-CGFLG	A ciszteinnel meghosszabbított enzimlabilis tetrapeptid szekvencia (GFLG) <i>N</i> -terminálisán acetilezett származéka
Aoa	aminoxiecsav
CF-GnRH-III(2-10)	A GnRH-III molekulából szintetikusán előállított <i>N</i> -terminálisán acetilezett fragmens molekulák 5(6)-
CF-GnRH-III(3-10)	karboxifluoreszceinnel jelölt származékai
CF-GnRH-III(4-10)	Klóracetilsoporttal funkcionizált enzimlabilis távtartó
ClAc-GFLG	szekvencia
Dau	daunorubicin
<i>D</i> -Cys <sup>6</sup>	A hatos pozícióban <i>D</i> -ciszteint tartalmazó GnRH molekula
<i>D</i> -Lys <sup>6</sup>	A hatos pozícióban <i>D</i> -lizint tartalmazó GnRH molekula
Dox	doxorubicin
GnRH-I	A gonadotrop-releasing hormon I, II és III típusa
GnRH-II	
GnRH-III	
GnRH-III(CF)	A GnRH-III molekula Lys <sup>8</sup> oldalláncán 5(6)-
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] <sub>2</sub>	karboxifluoreszceinnel jelölt származéka
[GnRH-III(H-CGFLG)] <sub>2</sub>	A GnRH-III ciszteinnel meghosszabbított távtartóval
H-CGFLG	rendelkező származékainak dimer formái
	Szabad <i>N</i> -terminálissal rendelkező ciszteinnel
	meghosszabbított enzimlabilis tetrapeptid szekvencia (GFLG)
[( <sup>3</sup> H)Pro <sup>9</sup> ]GnRH	A kilencedik pozícióban triciált prolint tartalmazó GnRH
	molekula



## Szintézis

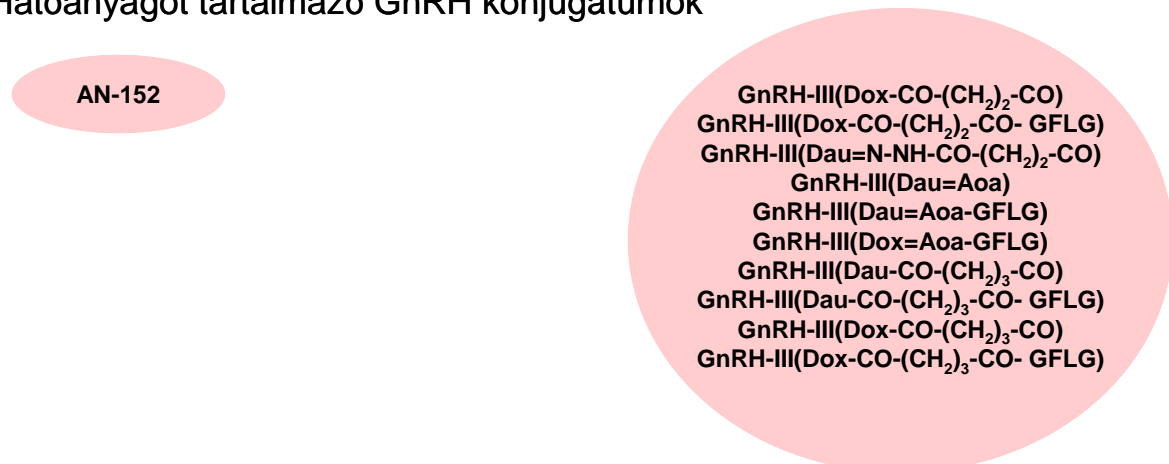
### Monomer származékok



### Dimer származékok



### Hatóanyagot tartalmazó GnRH konjugátumok



15. ábra: A célkitűzésekben foglalt GnRH származékok szintézisének vázlatos ábrája

## *In vitro* vizsgálatok

**Kötődésvizsgálat** (triciált GnRH származékok)

**Sejtbejutás vizsgálat**  
(fluoreszcens és hatóanyagot tartalmazó származékok)

**Citosztatikus hatás (MTT-teszt)**  
(hatóanyagot tartalmazó GnRH  
konjugátumok)

**Antiproliferatív hatás** (GnRH-III dimer származékok)

## *Ex vivo* vizsgálat

**LH-szekréció** (GnRH-III dimer származékok)

## *In vivo* vizsgálatok

***In vivo* toxicitás**  
(GnRH-III dimer származékok,  
hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum)

***In vivo* tumorelleses hatás**  
(GnRH-III szimmetrikus dimer származékok,  
hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum)

**Enzimstabilitási vizsgálatok**  
(hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum)

16. ábra: A célkitűzésekben foglalt GnRH származékok *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatának vázlatos ábrája

## 4 Eredmények

Doktori munkám során új GnRH-III származékokat állítottam elő, hogy megnöveljem a natív hormon tumorellenes hatását. A tumornövekedést gátló hatást kétféleképpen kívántam fokozni. Egyrészt dimer származékokat terveztem, ahol GnRH-III molekulát kapcsoltam egy másik GnRH hormon analóghoz (GnRH-I, GnRH-II vagy GnRH-III) közvetlenül, vagy enzimlabilis távtartón keresztül. Ezek a dimerek ellenállóbbak a proteolitikus folyamatokkal szemben, valamint sejtfelszíni receptorokat kapcsolhatnak össze, és a mikroaggregáció folytán megnövekedhet a peptid sejtbejutási képessége és/vagy tumorellenes hatása. Másrészt hatóanyagot kapcsoltam a GnRH-III molekulához, hogy a citosztatikum segítségével növeljem az önmagában is tumorellenes hatással bíró hormon analóg hatását.

Számos GnRH analógot (natív hormonok, *D*-aminosavat tartalmazó GnRH molekulák, GnRH-III dimer származékok, fluoreszcensen jelölt analógok, izotóp jelölésre alkalmas származékok, hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok) állítottam elő, tisztítottam és analitikailag jellemeztem. Az előállított molekulákkal *in vitro* (sejtbejutási képesség, antiproliferatív-, citosztatikus hatás humán és egér tumorsejtvonalakon), *ex vivo* (endokrin hatás), és *in vivo* (toxicitás, és tumornövekedést gátló hatás) vizsgálatokat végeztünk.

### 4.1 A GnRH peptidek és hatóanyagot tartalmazó GnRH konjugátumok szintézis

#### 4.1.1 Lineáris GnRH származékok szintézise

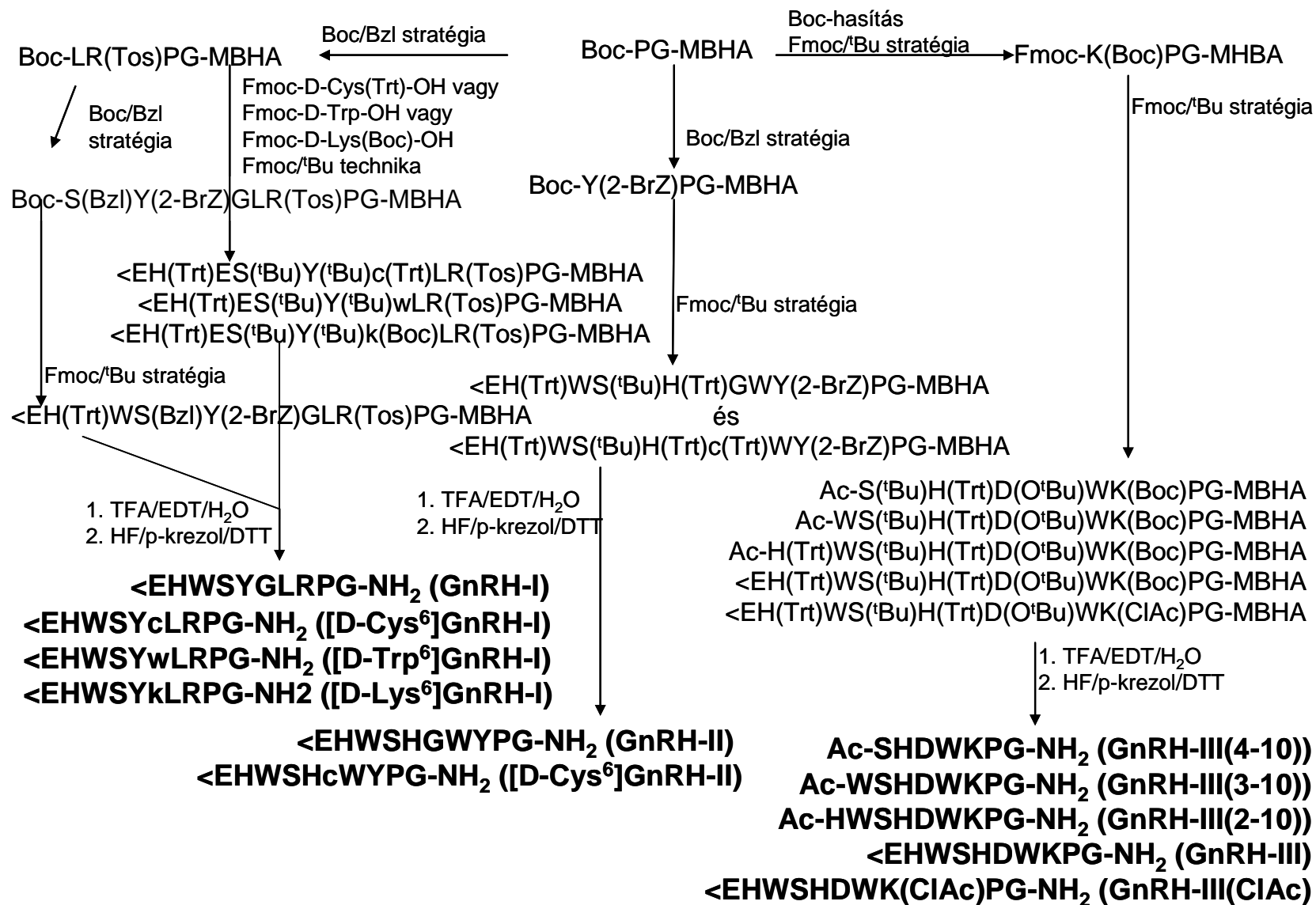
A lineáris GnRH származékok szintézisét manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével valósítottam meg. A peptideket MBHA gyantán építettem fel vegyes Boc/Bzl-Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával. Ezt a módszert azért alkalmaztam, mert korábbi tapasztalataink alapján így tudunk jó kitermeléssel, nagy tisztaságú nyers terméket előállítani, és egyben ez a módszer lehetővé tette az oldalláncot tartalmazó peptidek egyszerű és olcsó előállítását is. A Boc-aminosavakat általában a triptofánt megelőző aminosav beépítéséig, illetve az elágazást tartalmazó aminosavig alkalmaztam. Ezek alapján a GnRH-I (<EHWSYGLRPG-NH<sub>2</sub>) esetében a hét C-terminális aminosavat Boc/Bzl stratégia alkalmazásával kapcsoltam a gyantához (Gly, Pro, Arg, Leu, Gly, Tyr, Ser), míg a *D*-aminosavas származékai (<EHWSYcLRPG-NH<sub>2</sub>, <EHWSYwLRPG-NH<sub>2</sub>, <EHWSYkLRPG-NH<sub>2</sub>) esetében a megfelelő Fmoc-védett *D*-aminosavszármazék beépítéséig alkalmaztam a Boc/Bzl stratégiát. A GnRH-II (<EHWSHGWYPG-NH<sub>2</sub>) és *D*-aminosavas származékánál

(<EHWSHcWYPG-NH<sub>2</sub>) a triptofán beépítéséig, míg a GnRH-III (<EHWSHDWKPG-NH<sub>2</sub>) és a rövidített GnRH-III szekvenciák (Ac-HWSHDWKPG-NH<sub>2</sub>, Ac-WSHDWKPG-NH<sub>2</sub>, Ac-SHDWKPG-NH<sub>2</sub>) esetében az Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazék beépítéséig végeztem a szintézist Boc-stratégiával. A Boc/Bzl stratégiánál az *N*-terminális Boc védőcsoportot 33% TFA/DCM elegyével hasítottam le, ezt követően mostam és semlegesítettem a gyantát kapcsolás előtt. A kapcsolást (Boc-Aaa-OH/HOBt/DCC) követő mosási lépések (DMF, DCM) után ninhidrin, illetve izatin teszttel ellenőriztem a kapcsolás sikerességét. A szintézisek menetét a 17. ábra mutatja.

A molekulák további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával építettem fel, mely során az Fmoc-védett aminosavszármazékokról lehasítottam az Fmoc védőcsoportot 2% piperidin/ 2% DBU/DMF elegyével, mostam a peptid-gyantát dimetilformamiddal, majd Fmoc-Aaa-OH/HOBt/ DIC aminosavszármazék és kapcsoló reagensek elegyével kapcsoltam a következő aminosavat a peptidlánchoz. A kapcsolás sikerességét ebben az esetben is ninhidrin teszttel ellenőriztem. A rövidített GnRH-III fragmensek kivételével minden peptid esetében az *N*-terminális aminosav piroglutaminsav volt, melyet védőcsoport alkalmazása nélkül kapcsoltam a peptid-gyantára.

A szintézis végén kétlépéses hasítási protokolt hajtottam végre. Az első lépésben a Trt, <sup>t</sup>Bu és a Boc csoportok eltávolítását hajtottam végre TFA-víz-EDT elegy alkalmazásával szobahőmérsékleten. A védőcsoportok hasítását mosási, semlegesítési lépések követték. A klóracetilcsoportot tartalmazó származékok esetében a semlegesítést követő mosás után gyantakapacitásra számolt 5 ekvivalens klórecetsav-pentaklórfenil-észterrel (ClAc-OPcp) szobahőmérsékleten a még gyantán lévő nem védett peptidet reagáltattam. Végül a peptidet hidrogénfluoriddal hasítottam le a gyantáról *p*-krezol, DTT, illetve a klóracetilcsoportot tartalmazó származék esetén *p*-krezol és *p*-tiokrezol jelenlétében<sup>201</sup>.

A lineáris GnRH származékok szintézisének leírása a kísérleti rész 5.2.1 fejezetben található. A szintézis menetét a 17. ábra foglalja össze.



17. ábra: A lineáris GnRH származékok szintézisének menete

A kapott nyers peptideket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam meg, majd a tiszta termékeket analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével kémiaiileg jellemeztem (2. táblázat).

2. táblázat: A lineáris GnRH származékok analitikai paramétereit

GnRH származék	$t_R^*$ (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
GnRH-I	18,0	1182,6	1182,0
GnRH-II	23,2	1236,5	1236,6
GnRH-III	21,5	1259,6	1259,6
GnRH-III(2-10)	21,9	1189,5	1189,8
GnRH-III(3-10)	23,6	1052,5	1052,8
GnRH-III(4-10)	16,2	866,4	866,2
GnRH-III(ClAc)	22,5	1337,1	1337,1
[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	23,8	1228,6	1228,4
[D-Trp <sup>6</sup> ]GnRH-I	24,5	1311,3	1312,1
[D-Lys <sup>6</sup> ]GnRH-I	19,7	1253,6	1253,9
[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	24,3	1283,4	1283,1

\*: Retenciósi idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10 $\mu$ m, 300 $\text{\AA}$ ; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

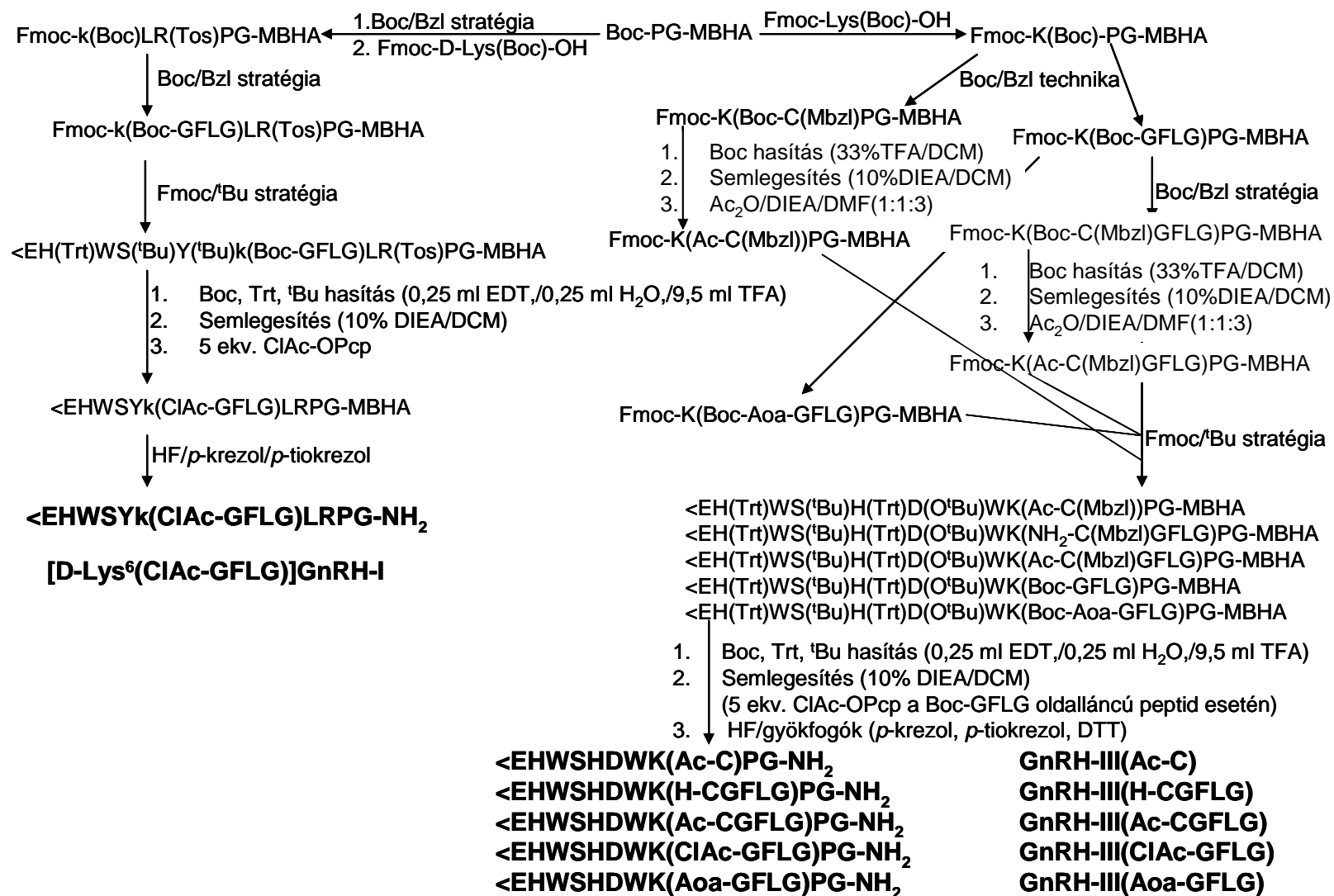
†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.2 Elágazó láncú GnRH származékok szintézise

A különböző elágazó láncot tartalmazó GnRH származékokat manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével állítottam elő, hasonlóan a lineáris származékok szintéziséhez. A szintézis során vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával MBHA gyantán építettem fel a peptid származékokat. A GnRH-III (<EHWSHDWK(X)PG-NH<sub>2</sub>, ahol X: Ac-C; ClAc-GFLG; Aoa-GFLG; H-CGFLG; Ac-CGFLG) származékok esetén az első két C-terminális aminosavat (Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH) Boc/Bzl stratégia alkalmazásával kapcsoltam a gyantához, ezt követően Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazékot kötöttem a peptid-gyantához. A GnRH-I származék (<EHWSYk(X)LRPG-NH<sub>2</sub>, ahol X: ClAc-GFLG) szintézisekor a C-terminális első négy aminosavat (Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Arg(Tos)-OH és Boc-Leu-OH), majd Fmoc-D-Lys(Boc)-OH származékot kapcsoltam a peptid-gyantához. Minden esetben a lizin oldalláncát védő Boc védőcsoportot távolítottam el a következő lépésben, és kiépítettem a megfelelő szekvenciájú oldalláncokat Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Phe-OH és Boc-Cys(Meb)-OH aminosavszármazékok felhasználásával. Az oldallánc N-terminálisának módosítását, így pl. acetil- és klóracetilcsoport, illetve oxim-, hidrazon- és észterkötés kialakítására alkalmas csoportok beépítését azok típusától függően rögtön az oldallánc kiépítése után, vagy a szintézis egy későbbi lépésében végeztem. Az oldalláncon acetilezett

GnRH-III származékok esetében az *N*-terminális cisztein Boc védőcsoportjának eltávolítását követően ecetsav-anhidriddel acetileztem az aminocsoportot. Az aminooxicsoportot (Aoa) tartalmazó GnRH-III származék esetén Boc védett aminooxiecetsavat kapcsoltam az oldallánc *N*-terminális glicinjéhez. A peptidek további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával építettem fel; a lizin Fmoc védőcsoportját eltávolítottam, majd GnRH-III származékok esetében: Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH és Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, míg GnRH-I származék szintézisekor Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-His(Trt)-OH és Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH aminosavszármazékok felhasználásával végeztem a szintézist. Végül, a lineáris peptidekhez hasonlóan, védőcsoportot nem tartalmazó piroglutaminsavat kapcsoltam a molekulák főláncának *N*-terminálisára. A fent leírt kétlépéses hasítási protokoll alkalmazásával kaptam meg az elágazó láncú szabad peptideket. A klóracetilcsoportot tartalmazó származékok esetében az első hasítási lépést követő mosási, semlegesítési lépések után gyantakapacitásra számolt 5 ekvivalens ClAc-OPcp-vel 2 órán át szobahőmérsékleten reagáltattam a védőcsoportot már nem tartalmazó peptid-gyantát. A ciszteint tartalmazó GnRH-III származékok metilbenzil (Meb) védőcsoportja a peptiddel egy lépésben hasítható HF-dal *p*-krezol és 1,4-*DL*-ditiotreitol jelenlétében. A klóracetilezett származékoknál *p*-krezol és *p*-tiokrezol gyökfogókat alkalmaztam<sup>201</sup>. Az aminooxicsoporttal funkcionizált elágazó láncú GnRH-III hasítását a gyantáról a ciszteint tartalmazó GnRH-III származékokhoz hasonlóan HF-dal *p*-krezol és DTT jelenlétében végeztem.

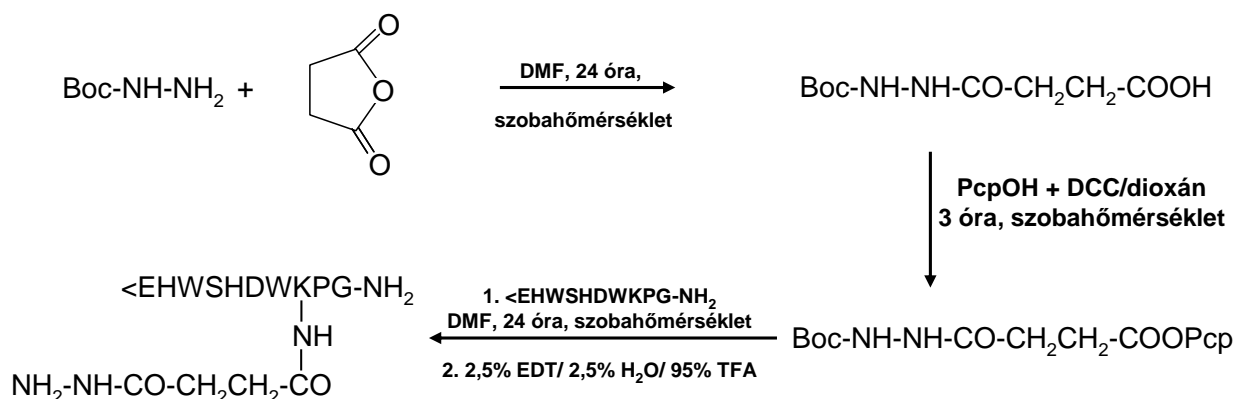
A elágazó láncú GnRH-III peptidek szintézisének leírása a kísérleti rész 5.2.2.1 (elágazó láncú GnRH-III származékok), a [*D*-Lys<sup>6</sup>(ClAc-GFLG)]GnRH-I szintézise a kísérleti rész 5.2.2.3 fejezetében található. Az szintézis menetét a 18. ábra foglalja össze.



18. ábra: Az elágazó láncú GnRH származékok szintézisének menete



A hidrazincsoportot tartalmazó GnRH-III származék előállításához a szintézis végén oldatban kapcsoltam az általunk előállított Boc-NH-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOPcp aktív észter származékot a lineáris GnRH-III peptidhez a kísérleti rész 5.2.2.2 fejezete alapján (19. ábra).



19. ábra: A GnRH-III(NH<sub>2</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO) előállítása

A peptidhez történő kapcsolást követően a hidrazincsoport Boc védőcsoportját eltávolítottam TFA–víz–EDT elegy alkalmazásával szobahőmérsékleten.

A GnRH-III(Aoa-GFLG) kivételével, a nyers termékeket tisztítottam, kémiaileg jellemeztem a további felhasználás előtt (3. táblázat). Ez utóbbi peptidet az aminoszocsoport érzékenysége miatt tisztítás nélkül használtam a konjugálásra, csak a karakterizáláshoz szükséges mennyiséget tisztítottam meg.

3. táblázat: Elágazó láncú GnRH származékok analitikai jellemzése

GnRH származék	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (perc)	M <sub>mo</sub> <sup>†</sup> (számított)	M <sub>mo</sub> <sup>†</sup> (mért)
GnRH-III(ClAc-GFLG)	27,2	1711,3	1711,7
GnRH-III(Aoa-GFLG)	25,6	1706,8	1706,4
GnRH-III(Ac-C)	23,3	1404,6	1404,4
GnRH-III(H-CGFLG)	22,9	1735,6	1735,5
GnRH-III(Ac-CGFLG)	26,7	1778,6	1778,7
[D-Lys <sup>0</sup> (ClAc-GFLG)]GnRH-I	27,7	1705,3	1704,8
GnRH-III(NH <sub>2</sub> -NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO)	20,9	1373,3	1373,6

\*: Retenciós idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10µm, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.3 Radioaktívan jelölt GnRH származékok szintézise

Receptorhoz való kötődési képesség méréséhez radioaktívan jelölt GnRH származékok szintézisére volt szükség. Ennek érdekében mindhárom molekula esetén a szekvencia kilencedik pozícióban lévő prolin helyére 3,4-dehidro-prolint ( $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-I,  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-II és  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-III) építettem be, mely alkalmassá teszi a molekulát a tríciummal való jelölésre.

A szintézist szilárdfázisú peptidszintézis módszerével, manuálisan, vegyes Boc/Bzl-Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával valósítottam meg MBHA gyantán a lineáris molekulák szintézisével megegyező módon a kísérleti rész 5.2.3. fejezetében leírtak szerint.

A szintézis végén a fent leírt kétlépéses hasítási protokoll alkalmazásával kaptam meg a szabad peptideket.

A szintézist és hasítást követően szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam meg a nyers termékeket, majd analitikailag jellemeztem őket retenciós idejük és molekulatömegük alapján (4. táblázat). A GnRH-III származék esetében melléktermékként 18-cal kisebb molekulatömegű anyag képződött, melynek MS/MS analízise alapján gyűrűs származék (Asp<sup>6</sup> és Lys<sup>8</sup> között jött létre kötés) képződésére lehetett következtetni.

4. táblázat: A  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-III és  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-II analitikai paraméterei

GnRH származékok	$t_R$ * (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
$[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-I	18,2	1180,6	1180,4
$[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-II	23,0	1236,5	1236,0
$[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-III	20,1	1258,6	1258,6

\*: Retenciós idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10 $\mu$ m, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ionspádás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

A peptidek triciálását a Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében végeztük.

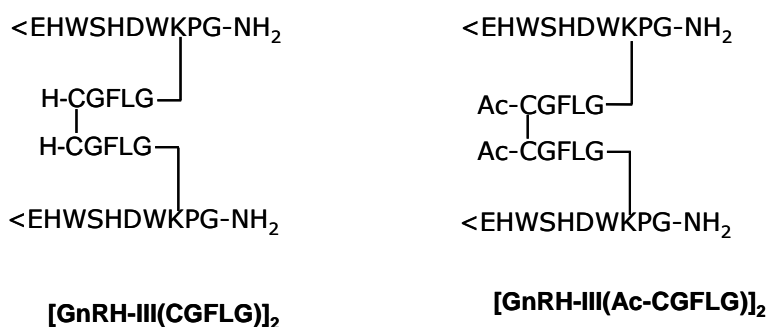
A  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-III és  $[\Delta\text{Pro}^9]$ GnRH-II származékokból PdO/BaSO<sub>4</sub> katalizátor jelenlétében trícium gáz felhasználásával radioaktívan jelölt GnRH származékok ( $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]$ GnRH-III és  $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]$ GnRH-II) állíthatók elő. A jelölést követően meghatároztuk nyers, jelölt peptidek radioaktivitását. Ezt követően radioaktív detektorral ellátott analitikai RP-HPLC rendszeren választottuk el a jelölt és jelöletlen peptideket egymástól. Végül meghatároztuk a tiszta triciált peptidek fajlagos aktivitását. GnRH-II (59 Ci/mmol) esetében

nagyobb fajlagos aktivitást kaptunk, mint a GnRH-III (44 Ci/mmol) esetében. A GnRH-I származék trícíálása folyamatban van.

#### 4.1.4 A GnRH-III dimer származékainak előállítása

##### 4.1.4.1 Szimmetrikus dimerek előállítása

Az előzőekben leírt elágazó láncú GnRH-III molekulák, amelyek az oldalláncban távtartó szekvenciát tartalmaztak [GnRH-III(H-CGFLG): <EHWSHDWK(NH<sub>2</sub>-CGFLG)PG-NH<sub>2</sub> és GnRH-III(Ac-CGFLG): <EHWSHDWK(Ac-CGFLG)PG-NH<sub>2</sub>] a levegő oxidációjának hatására enyhén alkalikus közegben (0,1M Tris-puffer, pH 8,1) dimerizálódnak (kísérleti rész 5.2.4.1. fejezet). A diszulfidhíd kialakítását, amely szimmetrikus dimereket (20. ábra) eredményezett szobahőmérsékleten végeztem.



20. ábra: Szimmetrikus dimerek szerkezete

Az acetilezett származék teljes elreagálásához két napra volt szükség, míg a nem acetilezett analóg esetében 24 óra reakcióidő elegendő volt. A dimerek jellemzését az 5. táblázatban foglalom össze. Más esetekben is azt tapasztaltuk, hogy az *N*-terminálison nem acetilezett ciszteint tartalmazó peptidek hajlamosabbak diszulfidhíd képzésre, mint acetilezett származékaik<sup>195</sup>.

5. táblázat: Szimmetrikus dimerek analitikai jellemzése

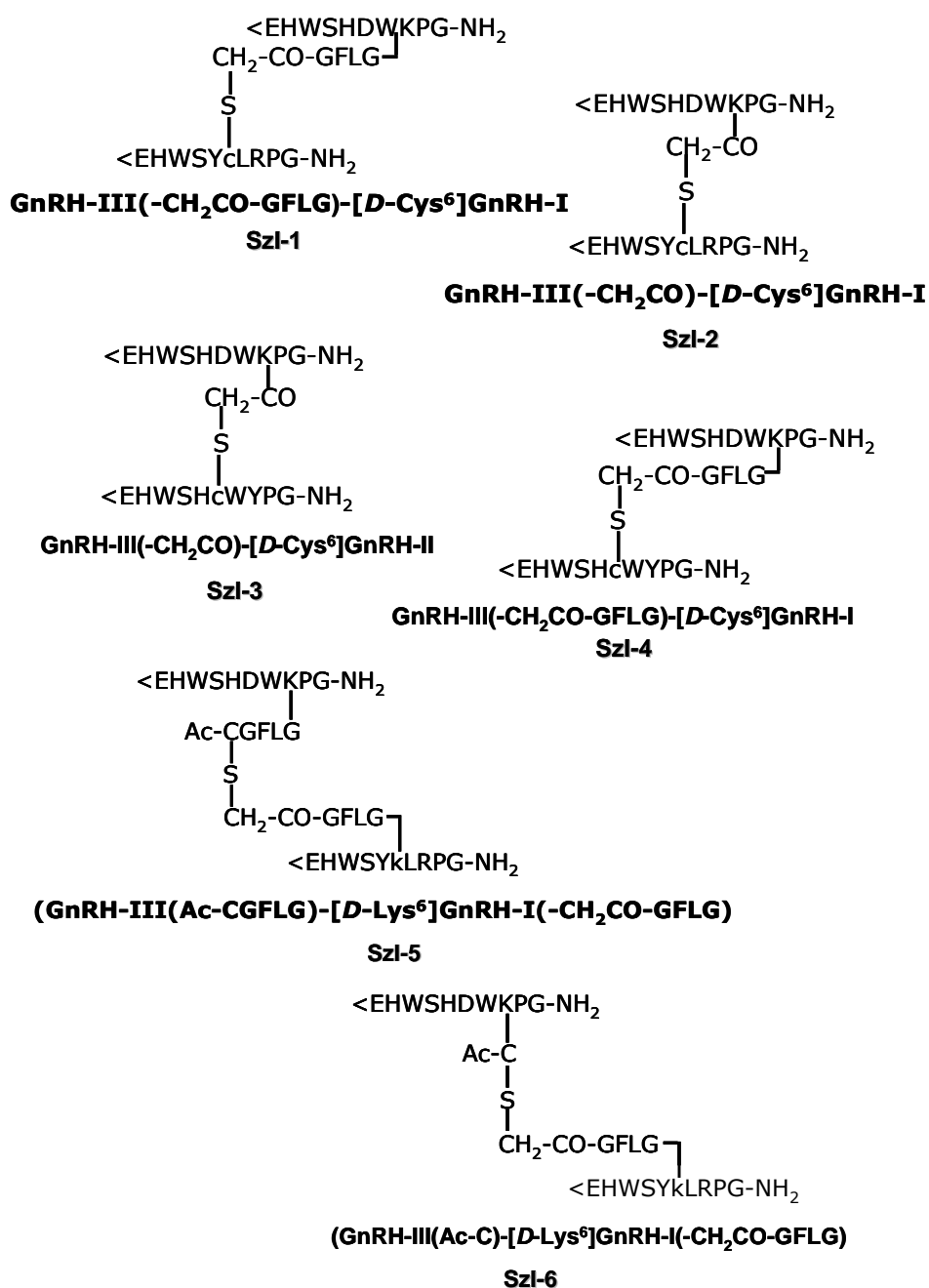
Szimmetrikus dimer származék	t <sub>R</sub> <sup>*</sup> (perc)	M <sub>mo</sub> <sup>†</sup> (számított)	M <sub>mo</sub> <sup>†</sup> (mért)
[GnRH-III(H-CGFLG)] <sub>2</sub>	27,2	3469,2	3469,5
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] <sub>2</sub>	29,4	3555,2	3555,5

\*: Retenció idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10µm, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.4.2 GnRH-III aszimmetrikus dimerek előállítása

Az irodalomban leírtak szerint a GnRH-III kevésbé kötődik a GnRH-I receptorhoz, mint maga a GnRH-I, illetve a GnRH-II receptorhoz, mint a GnRH-II<sup>191</sup>, ezért vizsgáltuk, hogy a GnRH-III antiproliferatív hatását hogyan befolyásolja, ha azt GnRH-I, illetve GnRH-II származékkal kapcsoljuk össze. A GnRH-III antiproliferatív hatásának növelése érdekében tehát GnRH-I és GnRH-II agonista származékokkal alkotott dimer analógjait terveztem. Ezek az agonista származékok *D*-aminosavat (*D*-ciszteint, illetve *D*-lizint) tartalmaznak a hatos pozícióban.



21. ábra: A GnRH-III aszimmetrikus dimerjeinek szerkezete

Hat különböző aszimmetrikus dimert állítottam elő (21. ábra), két *D*-ciszteint tartalmazó GnRH-I-GnRH-III, két *D*-ciszteint tartalmazó GnRH-II-GnRH-III, és két *D*-lizint tartalmazó GnRH-I-GnRH-III molekulákból álló struktúrákat, melyek a köztük lévő távtartó egységben különböznek egymástól.

Mivel az aszimmetrikus diszulfidhidak sok esetben sem kémiaailag, sem pedig a biológiai körülmények között nem stabilak (szimmetrikus dimerekké alakulhatnak), az aszimmetrikus dimerek kialakítására a jóval stabilabb kapcsolatot biztosító tioéterkötést választottam. A megtisztított és kémiaailag jellemzett szabad tiolcsoporttal, valamint klóracetilcsoporttal rendelkező peptidszármazékokat (0,1M, pH 8,1) Tris-pufferben feloldottam és három napig szobahőmérsékleten kevertettem, mialatt kialakult a tioéterkötés a megfelelő partnerek között (6. táblázat) (Kísérleti rész 5.2.4.2).

6. táblázat: GnRH-III aszimmetrikus dimerek kémiai jellemzése

Aszimmetrikus dimer származékok		$t_R^*$ (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
GnRH-III(-CH <sub>2</sub> CO-GFLG)-[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	<b>SzI-1</b>	24,6	2903,4	2903,0
GnRH-III(-CH <sub>2</sub> CO)-[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	<b>SzI-2</b>	23,9	2529,2	2529,0
GnRH-III(-CH <sub>2</sub> CO)-[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	<b>SzI-3</b>	24,4	2583,1	2583,6
GnRH-III(-CH <sub>2</sub> CO-GFLG)-[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	<b>SzI-4</b>	27,3	2957,3	2957,0
(GnRH-III(Ac-CGFLG)-[ <i>D</i> -Lys <sup>6</sup> ]GnRH-I(-CH <sub>2</sub> CO-GFLG)	<b>SzI-5</b>	27,8	3447,4	3447,6
(GnRH-III(Ac-C)-[ <i>D</i> -Lys <sup>6</sup> ]GnRH-I(-CH <sub>2</sub> CO-GFLG)	<b>SzI-6</b>	24,3	3073,4	3073,4

\*: Retenció idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10μm, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensok: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.5 Fluoreszcensen jelölt GnRH-III származékok szintézise

A GnRH-III származékok sejtbejutási képességének vizsgálatához fluoreszcensen jelölt (5(6)-karboxifluorescein, CF) molekulákra volt szükség. A GnRH-III monomer, rövidített fragmensek és egy dimer származék fluoreszcensen jelölt formáit állítottam elő,

A

$\text{<EHWSHDWKPG-NH}_2$

CF

**CF-GnRH-III**

B

Ac-HWSHDWKPG-NH<sub>2</sub>

CF

**CF-GnRH-III(2-10)**

Ac-WSHDWKPG-NH<sub>2</sub>

CF

**CF-GnRH-III(3-10)**

Ac-SHDWKPG-NH<sub>2</sub>

CF

**CF-GnRH-III(4-10)**

C

$\text{<EHWSHDWKPG-NH}_2$

CF-CGFLG

H-CGFLG

$\text{<EHWSHDWKPG-NH}_2$

**CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub>**

A jelöléshez a natív GnRH-III molekulát (22.A ábra), a fragmens peptideket (22.B ábra), valamint az oldalláncában acetilsoportot nem tartalmazó GnRH-III szimmetrikus dimert használtam fel. A jelölést dimetilformamidban végeztem bázis (DIEA) jelenlétében a laborban előzetesen előállított CF-OPcp felhasználásával<sup>202</sup> (kísérleti rész 5.2.4.3 fejezet). A reakció minden származék esetében lejátszódott két nap alatt szobahőmérsékleten folyamatos kevertetés mellett. A szimmetrikus dimer jelölésekor – feltehetően sztérikus okok miatt – a két cisztein aminos csoportjai közül csak az egyikhez kapcsolódott az 5(6)-karboxifluoreszcein molekula (22.C ábra).

53

Azonban ezek RP-HPLC-vel történő szétválasztására nem volt szükség, mert a sejtbefutási vizsgálatok során ez nincs befolyással a fluoreszcencia intenzitásra.

7. táblázat: 5(6) karboxifluoresceinnel jelölt GnRH-III származékok analitikai paraméterei

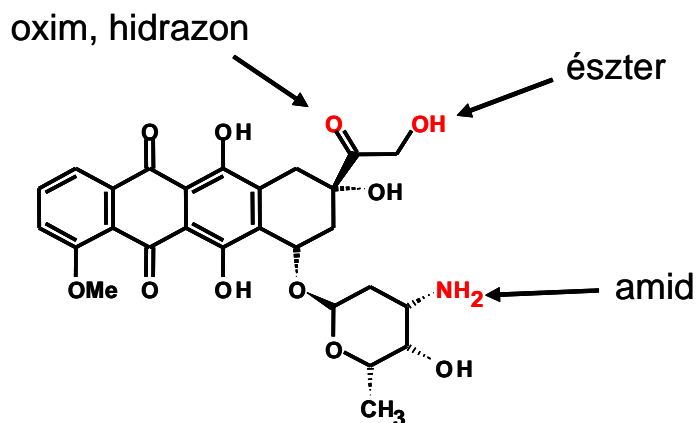
Fluoresceinnel jelölt GnRH-III származékok	$t_R^*$ (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
CF-GnRH-III	22,8	1617,9	1617,6
CF-GnRH-III(2-10)	23,8	1547,8	1548,3
CF-GnRH-III(3-10)	28,5	1410,8	1411,4
CF-GnRH-III(4-10)	26,1	1224,7	1224,6
CF-[GnRH-III(H-CGFLG)] <sub>2</sub>	24,6	3827,5	3828,0

\*: Retenciós idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10 $\mu$ m, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.6 Hatóanyag molekula funkcionálizálása

Hatóanyagként doxorubicint (Dox) és daunorubicint (Dau) kapcsoltam a GnRH-III peptidekhez. Ahogy a 23. ábra mutatja, a doxorubicinben három olyan funkciós csoport található, amelyek alkalmasak konjugációra.

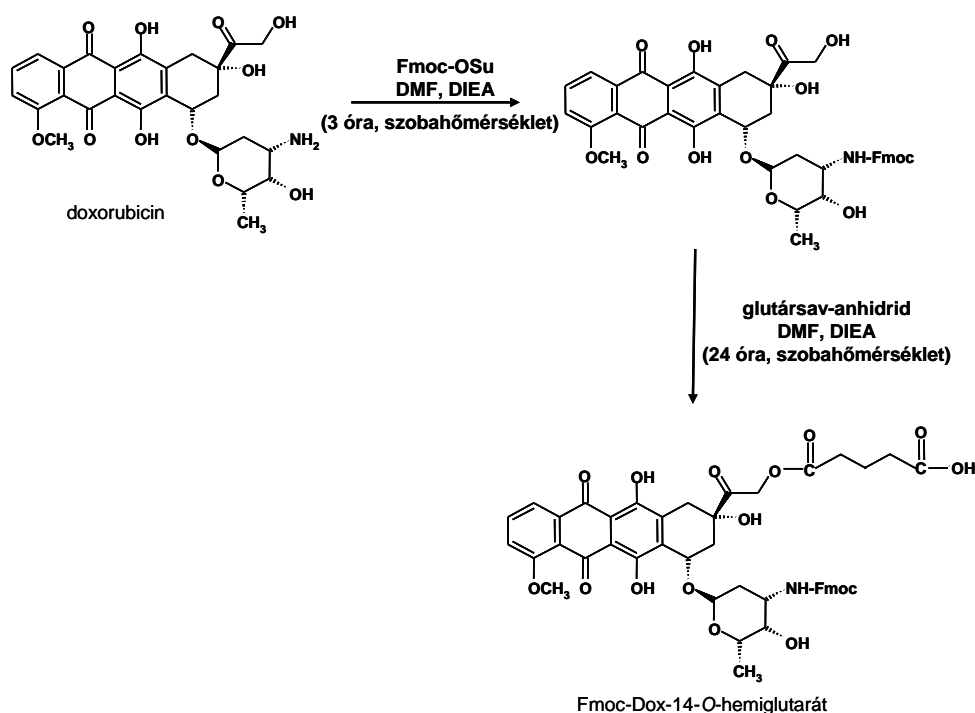


23. ábra: A doxorubicin lehetséges konjugációs helyei

A cukor rész (daunózamin) aminocsoportja amidkötés, a 13C atom oxocsoportja oxim-, illetve hidrazonkötés, míg a 14C-en lévő hidroxilcsoport észterkötés kialakítására alkalmas. Ez utóbbi csoport a daunorubicinben hiányzik, így a Dau csak az oxocsoportján vagy az aminocsoportján keresztül kapcsolható peptidekhez.

Az amid-, és észterkötésű konjugátumok előállításához a daunorubicin, illetve doxorubicin molekulák módosítására volt szükség. Mivel a doxorubicin aminocsoportja reaktívabb a hidroxilcsoportnál, ezért a szelektív észterképzés érdekében a cukor részen lévő aminocsoportot Fmoc-védett formába hoztam Fmoc-OSu felhasználásával bázis jelenlétében.

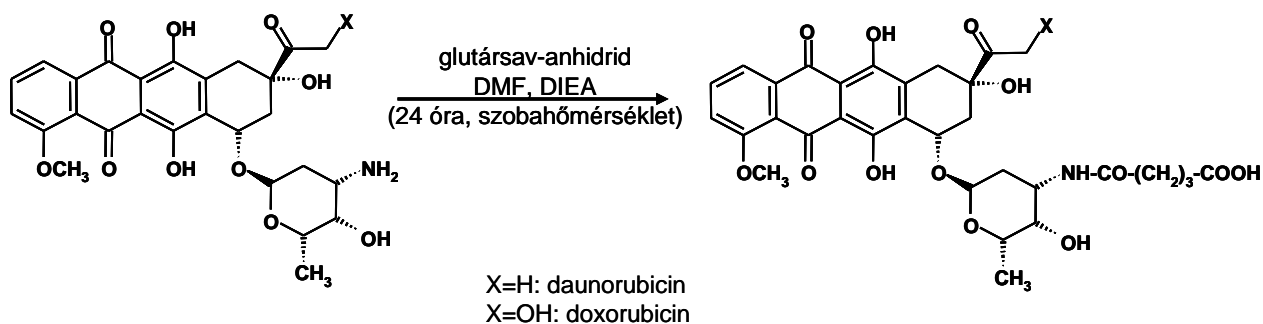
A molekula hidroxilcsoportját ezután glutársav-anhidriddel reagáltattam bázis jelenlétében. Így előállítottam az Fmoc-Dox-14-*O*-hemiglutarát származékot (22. ábra) a kísérleti rész 5.2.5 fejezetében leírt módon<sup>163</sup>.



24. ábra: Az Fmoc-Dox-14-*O*-hemiglutarát előállítása

Ezt az észterkötést tartalmazó vegyületet kapcsoltam később amidkötés kialakításával a peptidhez (kísérleti rész 5.2.6 fejezet), majd az Fmoc védőcsoportot 35% piperidin dimetilformamidos oldatával hasítottam (ld. 58. oldal, 27. ábra).

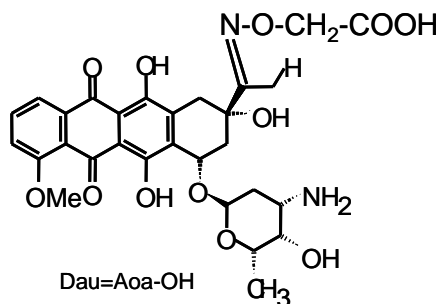
Előállítottam továbbá a hatóanyag molekulák cukor részének aminocsoportján funkcionizált származékát is. Ezt a reakciót ugyancsak glutársav-anhidriddel végeztem. A nem védett doxorubicinből vagy daunorubicinből közvetlenül a cukor rész *N*-hemiglutarát származékát kapjuk (kísérleti rész 5.2.5 fejezet) (25. ábra).



25. ábra: A cukor részben funkcionált hatóanyag molekulák előállítása (Dau/Dox-*N*-hemiglutarát)



Az aminosavakat a GnRH-III származékba építettem be a gyantán és az antraciklinekkel a konjugációt oldatban végeztem. Előállítottam továbbá a Dau aminosavval készült konjugátumát is *in vitro* biológiai vizsgálatokhoz. Ebben az esetben a daunorubicint és az aminosavakat DMF-0,2M NaOAc (1:1 v/v) elegyében oldva reagáltattam egy éjszakán át (26. ábra).



26. ábra: A daunorubicin aminosavval alkotott konjugátumának szerkezete

Ezt a vegyületet alkalmaztuk az oximkötés körüli térszerkezet meghatározására NMR vizsgálattal. Anélkül, hogy az NMR eredményeket részletezném (a méréseket Dr. Csámpai Antal végezte) elmondhatjuk, hogy a Dau=Aoa-OH vegyületben az oximkötés csak az *E*-izomer formát mutatja<sup>203</sup>.

A funkcionáliszt hatóanyagmolekulák analitikai paramétereit a 8. táblázat foglalja össze.

8. táblázat: A funkcionáliszt hatóanyag molekulák analitikai jellemzői

Hatóanyag származékok	$t_R^*$ (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
Dox- <i>O</i> -hemiglutarát	31,5	654,5	654,8
Dau- <i>N</i> -hemiglutarát	34,3	641,3	641,5
Dox- <i>N</i> -hemiglutarát	31,8	657,1	657,9
Dau=Aoa-OH	31,6	601,2	601,2

\*: Retenciós idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10 $\mu$ m, 300Å; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

#### 4.1.7 Hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok szintézise

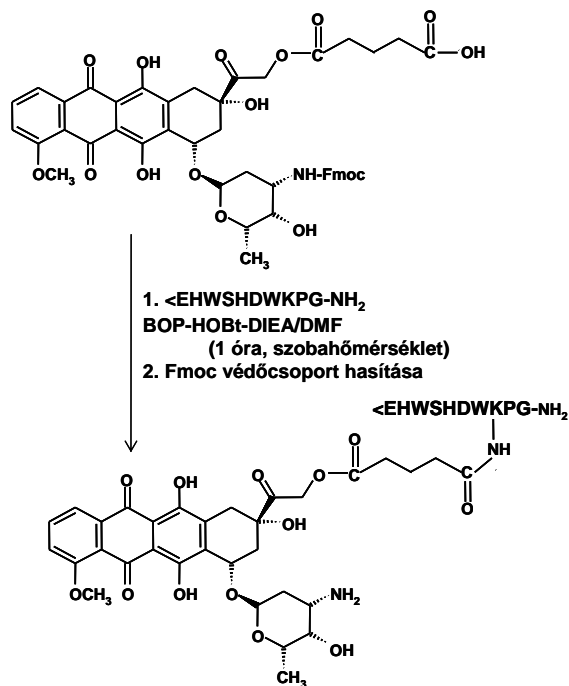
A hatóanyagot tartalmazó konjugátumok mindegyikét oldat fázisban állítottam elő négy különböző kötéstípussal a kísérleti rész 5.2.6 fejezetében foglaltak szerint:

(1) észter-, (2) hidrazon-, (3) oxim- és (4) amidkötéssel rendelkező GnRH-III konjugátumok előállítására volt lehetőségem.

1. Az észterkötést tartalmazó konjugátum előállításához is glutársav-anhidriddel előállított Fmoc-Dox-14-*O*-hemiglutarát származékot előaktiváltam BOP, HOBt és DIEA

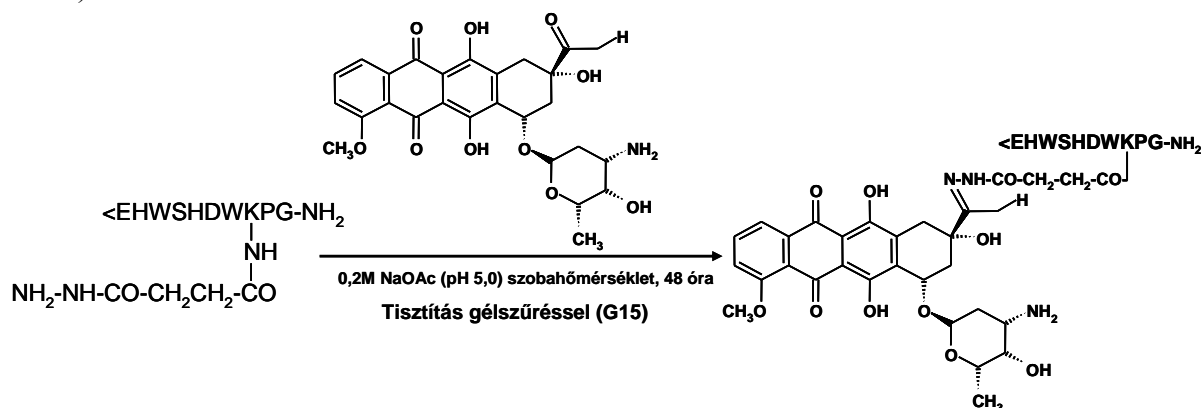
jelenlétében dimetilformamidban 15 percig, majd GnRH-III molekulával reagáltattam egy órán át. Erre azért volt szükség, mert a GnRH-III Asp oldallánca is reakcióba léphetne az aktiválószer jelenlétében a Lys  $\epsilon$ -aminocsoportjával.

Ezt követően eltávolítottam az Fmoc védőcsoportot a doxorubicin cukor részén lévő aminocsoportjáról piperidinnel<sup>204</sup> (27. ábra).



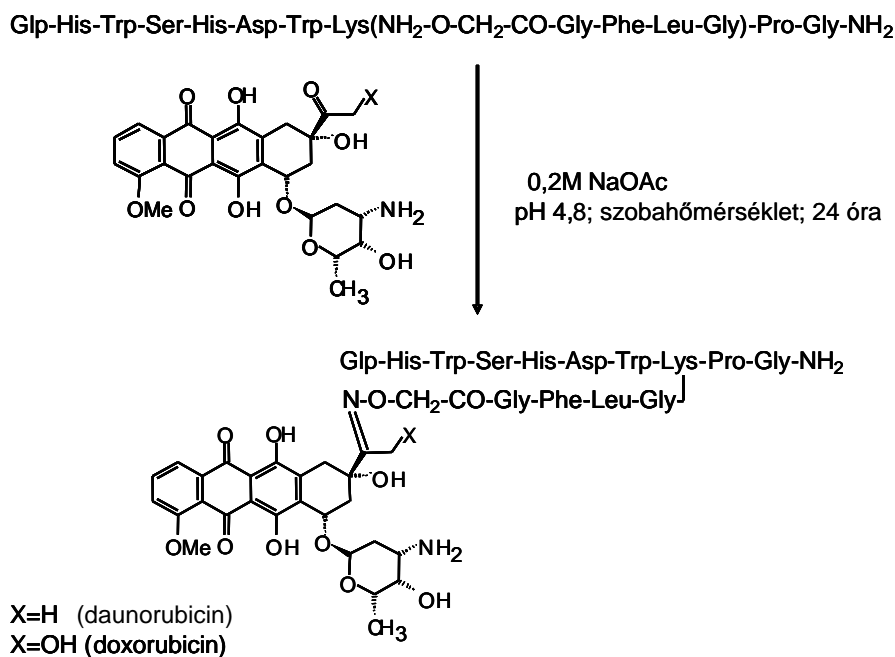
27. ábra: A GnRH-III(Dox-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO) előállítása

2. A hatóanyag molekula oxocsoportja és a peptid hidrazincsoportja között hidrazonkötés alakítható ki NaOAc-pufferben (0,2M pH 5,0) szobahőmérsékleten két nap alatt (28. ábra).



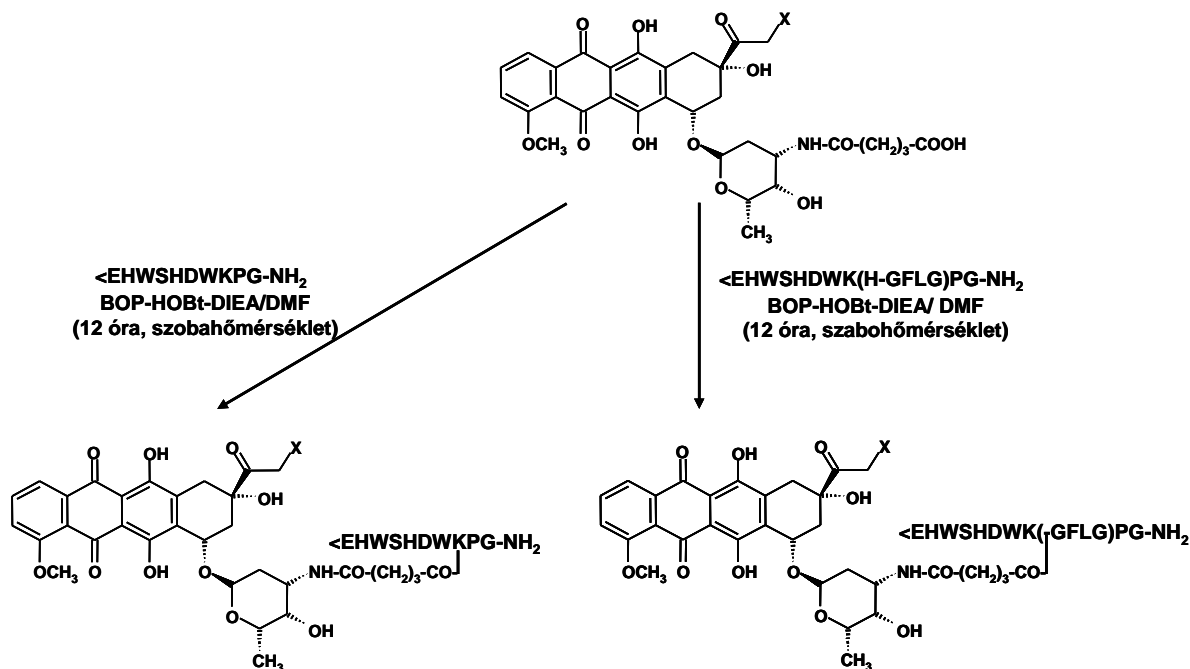
28. ábra: GnRH-III(Dau=N-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO) előállítása

3. Az oldalláncában aminosavakat tartalmazó GnRH-III molekula és a daunorubicin, illetve doxorubicin hatóanyagmolekulák oxocsoportja között 0,2M nátrium-acetát pufferben (pH 4,8) szobahőmérsékleten állandó kevertetés mellett egy nap alatt oximkötés kialakulásával járó kémiai ligáció jön létre (29. ábra).



29. ábra: A GnRH-III(Dau/Dox=Aoa-GFLG) előállítása

4. Az amidkötésű konjugátumok előállításakor az előzetesen cukor rész aminosavcsoportján funkcionáliszt Dau/Dox-N-hemiglutarátot használtam fel a peptidhez való konjugációban (30. ábra). A funkcionáliszt Dau, illetve Dox vegyületeket ebben az esetben is 15 percig előaktiváltam, majd ezután adtam az elágazást nem tartalmazó, illetve elágazó láncú GnRH-III molekulákhoz. A kapcsolást egy éjszakán át folytattam.



30. ábra: Az amidkötést tartalmazó GnRH-III konjugátumok szintézise

Az oxim- és hidrazonkötést tartalmazó konjugátumok esetén enyhén savas közeg (0,2 M NaOAc-puffer pH 4,8-5,0) volt optimális a megfelelő konjugátumok képződéséhez. Az észter- és amidkötésű konjugátumok viszont csak erélyes kapcsolószerek és bázis (BOP, HOBt, DIEA dimetilformamidban) jelenlétében képződtek.

Az összes reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem. A konjugációk végén az oxim-, észter- és amidkötést tartalmazó konjugátumokat savanyítás után szempipreparatív RP-HPLC-vel, a hidrazonkötést tartalmazó konjugátumokat pedig géliszűrőssel (G15) tisztítottam meg NH<sub>4</sub>OAc-puffer (0,2 M), mint eluens alkalmazásával. Erre azért volt szükség, mert a hidrazonkötés rendkívül érzékeny savas közegben, és a RP-HPLC körülményei között (0,1% TFA tartalmú eluensek alkalmazása) elbomlik, semleges oldatban viszont nem eluálódott az oszlopról. Az NH<sub>4</sub>OAc sótól többszöri vízből történő liofilizálással tudtam megszabadulni. A konjugátumok analitikai paramétereit (retenciós idő, molekulatömeg) meghatároztam analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel (9. táblázat).

A daunorubicin származékok az ESI-MS körülményei között nem túl stabilak. Megjelennek MS-termékek, amelyek elsősorban a daunózamin cukor rész hasadásából származnak. Ez negatív ionmód esetében kevésbé jelenik meg a spektrumban, illetve alacsonyabb ionizációs feszültség alkalmazásával némileg visszaszorítható.

9. táblázat: A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok analitikai jellemzése

Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III származékok	$t_R^*$ (perc)	$M_{mo}^\dagger$ (számított)	$M_{mo}^\dagger$ (mért)
GnRH-III(Dau=Aoa)	30,2	1844,0	1844,0
GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)	32,3	2218,9	2218,4
GnRH-III(Dox=Aoa-GFLG)	31,9	2234,9	2234,5
GnRH-III(Dau=N-NH-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO)	25,4	1748,8	1749,4
GnRH-III(Dau-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO)	31,2	1882,9	1883,1
GnRH-III(Dox-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO)	29,1	1900,0	1900,3
GnRH-III(Dau-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-GFLG)	34,8	2257,0	2257,4
GnRH-III(Dox-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CO-GFLG)	32,6	2274,0	2274,5
GnRH-III(Dox-O-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-GFLG)	31,8	2276,3	2276,5

\*: Retenció idő meghatározása Knauer HPLC rendszeren (oszlop: Phenomenex Synergi, C12, MAX RP, 10 $\mu$ m, 300 $\text{\AA}$ ; 250x10 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 1% B-Eluens; 5-50perc: 99% B-eluens; eluensek: A-Eluens: víz/0,1% TFA; B-Eluens: 80% acetonitril/20%víz/0,1% TFA)

†: monoizotópos molekulatömeg meghatározása Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ioncsapdás tömegspektrométerrel (spektrumok felvétele 50–2500 m/z tartományban)

A fejezet további részében az előállított molekulák enzimatiszus vizsgálatát, *ex vivo* endokrin hatását, valamint *in vitro* és *in vivo* eredményeit mutatom be.

#### 4.2 GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum enzimatiszus stabilitása

A humán terápia alkalmazás a hosszútávú cél, ezért vizsgáltuk a vegyületek enzimekkel (kimotripszin, katepszin B) és humán szérummal szembeni stabilitását. Az orális adagolást tartják a legmegfelelőbbnek a hatóanyagok szervezetbe juttatására, és ez különösen előnyös lehet a kolorektális tumoros megbetegedések esetén. Az orális adagolásnál számos nehézséggel kell szembenézni, mert a potenciális hatóanyagnak a gasztrointesztinális rendszerben jelenlévő biokémiai rendszereken és fizikai határfelületeken kell átjutnia, vagyis szélsőséges körülményeket kell kibírnia, úgy mint:

- savas pH;
- a hasnyálmirigyben termelődő endopeptidázok: kimotripszin, tripszin, elasztáz;
- az intesztinális kefeszegéllyel asszociálódott endo- és exopeptidázok (angiotenzin konvertáz enzim (ACE), aminopeptidázok és karboxipeptidázok)<sup>205, 206</sup>.

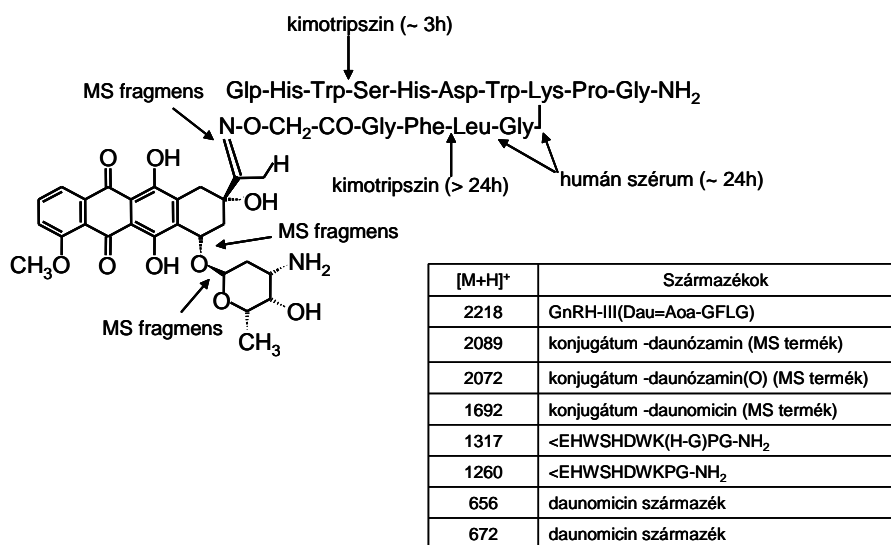
Mivel a GnRH származékok *N*-terminálison piroglutaminsavat tartalmaznak, *C*-terminálisukon a glicin amidált formában van, így az intesztinális lumenben lévő exopeptidázok nem képesek hatékonyan hasítani azokat.

A konjugátumnak tehát stabilnak kell lennie addig, amíg eljut a hatás helyére. Ott azonban a hatóanyagnak fel kell szabadulnia, hogy tumorellenes hatását kifejtsse.

*Walker és munkatársai*, valamint *Ledger és munkatársai* humán és lazac GnRH proteolitikus stabilitását vizsgálták hasnyálmirigy endopeptidázokkal szemben kapilláris elektroforézis alkalmazásával. Kimotripszin hatására mindkét fajta GnRH gyorsan elbomlott, viszont ha elasztáz is jelen volt a kimotripszin mellett, a hidrolízis jóval lassabbnak bizonyult. A tripszinnek 2 órás inkubálás alatt nem volt hatása a GnRH analógok bomlására. Az elasztáz okozta GnRH lebomlás feltehetően annak volt köszönhető, hogy szennyezőként kimotripszin volt jelen<sup>207, 208</sup>. Ezért ha orálisan felszívódó terméket kívánunk előállítani a GnRH-ból, úgy kell az analógokat megtervezni, hogy azokat a kimotripszin ne, vagy csak lassan tudja hasítani.

Előzetes vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy sem a GnRH-III, sem pedig dimer származékai nem szubsztrátjai a tripszinnek<sup>194</sup>. Ezért a konjugátum enzimátikus stabilitását humán szérummal és kimotripszinnel szemben vizsgáltuk. A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) oximkötésű konjugátum (ezt a konjugátumot kívántuk előként *in vivo* vizsgálatokban kipróbálni) kimotripszines emésztésének folyamatát analitikai RP-HPLC és MALDI-TOF tömegspektrometria segítségével követtük (kísérleti rész 5.3.1 fejezet). Azt tapasztaltuk, hogy a kimotripszin először a <sup>3</sup>Trp-<sup>4</sup>Ser közötti peptidkötést hasította el (GnRH-III-(4-10) és GnRH-III(1-3) fragmensek), mely három óra alatt teljesen lejátszódott. További két hasítási helyet azonosítottunk hosszabb idejű (6 – 24 órás) inkubálás során; a Phe-Leu és kis mértékben Leu-Gly között a molekula GFLG oldalláncában.

A  $^7\text{Trp}$ - $^8\text{Lys}$  között nem tapasztaltunk hasítást.



31. ábra: A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) enzimatisz stabilitása kimotripsinnel és humán szérummal szemben

Fontos megjegyezni, hogy a kimotripszines hasítás során kapott fragmens feltételezhetően (GnRH-III(4-10) képes bejutni a tumorsejtekbe (ld. 73. oldal, 4.5.2. fejezet, 35. ábra).

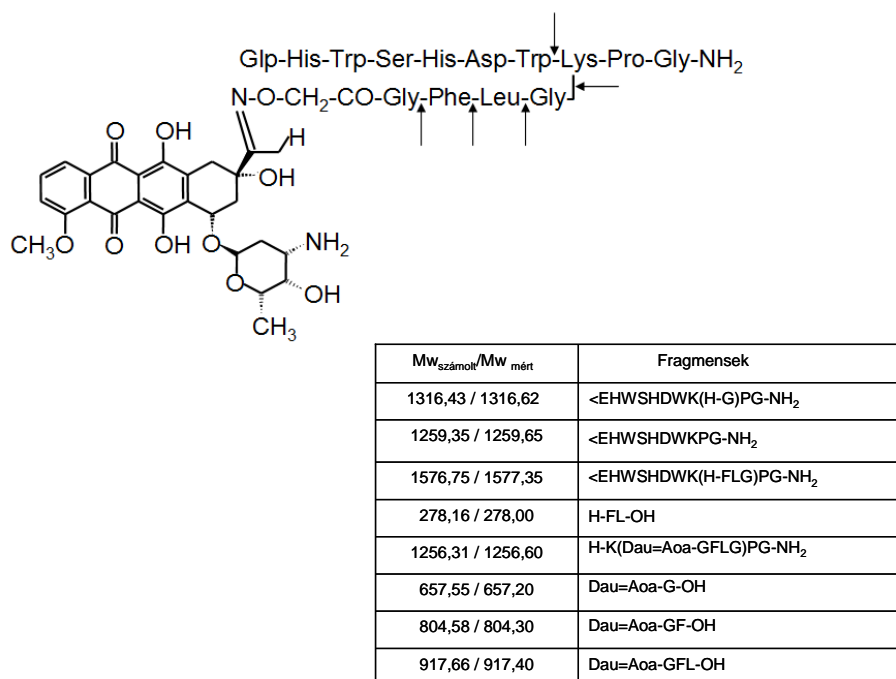
A 90%-os humán szérummal végzett vizsgálat során (kísérleti rész 5.3.2 fejezet) hat óra elteltével a reakcióelegy fő komponense az ép konjugátum volt, és még 24 óra elteltével is jelen volt a reakcióelegyben a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum. Viszont 48 óra elteltével már nem detektáltunk intakt konjugátumot. Emellett tömegspektrométerrel kis mennyiségben kimutatható volt a konjugátum GFLG oldalláncának Leu-Gly közti hasadási terméke, valamint a Lys(Gly) izopeptid kötés hasadása következtében képződött fragmens. A Lys(Gly) izopeptid kötés hasadása követte a Leu-Gly közti kötés hasítást, melyek során a szabad GnRH-III peptidet kaptuk meg<sup>204</sup> (31. ábra).

Kontrollként a vízben oldott GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot 37°C-on, 48 órán át inkubáltuk. A kontrol minta esetében sem a tömegspektrum, sem pedig a HPLC kromatogram nem mutatott lebomlási terméket. A tömegspektrumon találtunk három további terméket ( $m/z$  1692, 2072, és 2089), melyek a mérés során a tömegspektrométerben képződtek, és a daunorubicin, vagy daunózamin részt veszett peptidfragmensnek feleltethetők meg<sup>204</sup>.

A receptor közvetített endocitózissal a tumorsejtbe jutott konjugátumok miután a vezikulák összeolvadtak a lizoszómákkal, a lizoszómális enzimek hatására lebomlanak. Ebben a folyamatban az egyik kulcsenzim a katepszin B játszik szerepet, amely túltermelődik a

tumorsejtekben<sup>209</sup>. A GFLG szekvencia kiválasztása is azért történt, mert ez szubsztrátja a katepszin B enzimnek. Ezért a konjugátum lebomlását vizsgáltuk katepszin B jelenlétében is (kísérleti rész 5.3.3 fejezet).

Azt tapasztaltuk, hogy a katepszin B több helyen is hasítja a távtartóként szolgáló GFLG szekvenciát [Gly-Phe, Phe-Leu, Lys(Gly) izopeptidkötés], így Dau=Aoa-Gly-OH szabadul fel (32. ábra).



32. ábra: A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) tömegspektrumai katepszin B enzimmel történő 5 perces, 2, 4, 8 és 24 órás inkubálás után

Annak érdekében, hogy lássuk, vajon ez a fragmens tovább degradálódik-e lizoszomális körülmények között, vizsgálatokat végzünk lizoszóma preparátumokkal is. Ezek a kísérletek még folyamatban vannak.

Érdeemes megjegyezni, hogy a katepszin B hatására a GnRH-III peptidlánc <sup>7</sup>Trp-<sup>8</sup>Lys kötése is hasad még abban a fázisban is, amikor a lizinen oldallánc részlet található (32. ábra). Mint korábban láttuk, ez a kötés kimotripszinre nem hasadt, ha a lizin oldalláncon távtartó szekvencia volt jelen<sup>203</sup>.

10. táblázat: Az enzimátikus vizsgálatok összefoglaló táblázata

	Hasítási hely a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumban			
<b>Kimotripszin</b>	<sup>3</sup> Trp- <sup>4</sup> Ser (GnRH-III láncban)		Phe-Leu (spacerben)	
<b>90%-os humán szérum</b>	Lys(Gly) (GnRH-III láncban)		Leu-Gly (spacerben)	
<b>Katepszin B</b>	<sup>7</sup> Trp- <sup>8</sup> Lys (GnRH-III láncban)	Lys(Gly) (GnRH-III láncban)	Phe-Leu (spacerben)	Gly-Phe (spacerben)



### **4.3 LH-felszabadulási teszt (LH-releasing assay) patkány hipofízis sejteken. GnRH-III dimerek hatása az LH-szekréción**

A GnRH analógok két úton gátolhatják a tumornövekedést. Az egyik esetben (indirekt hatás) a gonadotrop sejtek GnRH receptorainak deszenzitizációja és downregulációja folytán a csökkenő, majd átmenetileg megszűnő gonadotropin hormon (LH, FSH) termelés hatására gátlődik a szexszteroidok termelődése, ezáltal pedig a hormonfüggő tumorok növekedése. Azonban ezt mindig megelőzi egy fokozott gonadotropin hormontermelés (flare up), amit különösen GnRH-I szuperagonistákkal lehet kiváltani. Így az egyik cél a GnRH analógok tervezésénél az lehet, hogy minél hatékonyabb agonistákat állítsunk elő, amelyek jelentősen tudják fokozni a gonadotropin hormontermelődést. A direkt tumorelles hatású vegyületek esetében viszont inkább arra törekednek, hogy azok minél szelektívebb tumorelles hatást mutassanak, így ezekben az esetekben épp a vegyületek endokrin hatásának csökkentése a cél. Tehát az új GnRH analógok endokrin aktivitását mindig célszerű megvizsgálni. Ezért az új dimerszármazékaink LH-szekréción gyakorolt hatását vizsgáltuk patkány hipofízis sejteken (kísérleti rész 5.4 fejezet).

A szimmetrikus GnRH-III dimer származékok LH-felszabadító képességük lényegesen gyengébb, mint a natív GnRH-III hormonnak. 1  $\mu\text{M}$  peptidkoncentrációt alkalmazva a GnRH-III megnövelte a sejtek bazális LH-szekréciónját  $405 \pm 18,9\%$  ( $p < 0,01$ )<sup>194</sup>. Ehhez képest a  $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-C})]_2$ , melyet előzetes kísérletekben vizsgálatok meg csupán  $132 \pm 12,0\%$ -kal ( $p < 0,01$ ) növelte meg a sejtek bazális LH-szekréciónját. Az új, *N*-terminálisán acetilezett távtartó szekvenciát tartalmazó GnRH-III dimer endokrin hatásának tanulmányozásakor a fent említett alacsony LH-szekrécións képességgel rendelkező  $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-C})]_2$  származékhoz hasonlítottuk a hatást. A  $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$  kb. további 50%-os LH-szekréción csökkenést eredményezett. Ha 100 nM koncentrációt alkalmaztunk, a GnRH-III  $106 \pm 9,85\%$  ( $p < 0,01$ ) LH-szekréción növekedést eredményezett, viszont a szimmetrikus dimer származék nem okozott változást az LH-szekréciónra nézve. Sem a GnRH-III, sem pedig a szimmetrikus dimer nem váltott ki mérhető LH-szekretáló hatást 10 nM vagy annál alacsonyabb koncentráció tartományban.

Az aszimmetrikus dimerek esetében az LH-szekréción jelentős volt 10 nM koncentrációban, ahol a GnRH-III monomer és szimmetrikus dimer származékok már nem mutattak kimutatható LH-szekréciónt serkentő hatást, hogy a pontos mérés érdekében 10 nM alatti koncentráció tartományban kellett a hipofízis sejteket az aszimmetrikus dimerekkel kezelni.

Az aszimmetrikus dimerek esetében három csoportot különítettünk el az alapján, hogy a dimerek milyen *D*-aminosavat tartalmazó GnRH-I, vagy GnRH-II analógból épültek fel. Az egyes csoportba tartoznak a [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-I tartalmú dimerek, a kettes csoport a [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-II-t magában foglaló dimereket tartalmazza, míg a harmadik csoportot a [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I alapú analógok alkotják. Minden csoportban a *D*-aminosavat tartalmazó lineáris GnRH-I, illetve GnRH-II analóg LH-szekrécióna gyakorolt hatását tekintettük 100%-nak (kontroll), és ehhez viszonyítottuk a megfelelő dimerek endokrin hatását.

A [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-I molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimerek esetén a 0,1 nM-os koncentrációban kaptunk fokozottabb LH-szekrécióna (Szl-1: 154±7,5%, Sl-2: 150±8,5%,) (11. táblázat).

11. táblázat: A GnRH-III dimer származékainak LH-szekrécióna gyakorolt hatása patkány hipofízis sejteken

Csoport	Analógok	LH-felszabadulás (kontroll (%))		
		0,1nM	1nM	1000nM
1	[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I (kontroll)	100	100	
	Szl-1	154±7,5	16,3±0,75	
	Szl-2	150±8,5	20,5±5	
2	[ <i>D</i> -Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II (kontroll)	0	100	
	Szl-3	0	36±6	
	Szl-4	0	110±8,5	
3	[ <i>D</i> -Lys <sup>6</sup> ]GnRH-I (kontroll)	100	100	
	Szl-5	101±7	191±17,5	
	Szl-6	246±7,5	135±19,5	
4	GnRH-III(Ac-C) dimer (kontroll)			148±41
	GnRH-III(Ac-CGFLG) dimer			100

Ezzel szemben a [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-II molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimereknél 0,1 nM-os koncentráció esetén nem tapasztaltunk LH-szekrécióna változást, viszont 1 nM-nál szignifikáns endokrin hatás figyelhető meg (Szl-3: 36±6,0%, Sl-4: 110±8,5%,) (11. táblázat).

A szuperagonista [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I molekulát tartalmazó aszimmetrikus dimerek esetén mind 0,1 nM, mind pedig 1 nM-os koncentrációban közel azonos endokrin hatás figyelhető meg (Szl-5: 101±7,0%, illetve 191±17,5%; Sl-6: 246±7,5%, illetve 135±19,5%) (11. táblázat).

Az endokrin hatás szempontjából a dimereket két csoportra oszthatjuk. Míg a szimmetrikus GnRH-III dimerek nem rendelkeznek jelentős endokrin hatással, sőt ez a hatás kisebb, mint a monomer vegyületé, addig az aszimmetrikus dimerek (a *D*-ciszteint tartalmazó GnRH-II származékok kivételével) még 0,1 nM-os koncentrációban is jelentős LH-

felszabadító képességgel bírnak. Mivel a GnRH-III dimerek nem rendelkeznek jelentős LH-felszabadító képességgel és a GnRH-III is elhanyagolható endokrin hatású 10nM alatti koncentrációban, így elmondható, hogy az aszimmetrikus dimerek endokrin hatását a molekulában lévő másik komponens határozza meg. Az SzI-6 dimer, mely a szuperagonista [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I molekulát tartalmazza, bizonyult a legmagasabb endokrin hatással rendelkező vegyületnek.

A tumorterápiában használt vegyületek hatásmechanizmusuk alapján kétféleképpen lehetnek: (1) direkt hatásúak, melyek a tumor felszínén található receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat és nem rendelkeznek hormonális tulajdonsággal, (2) indirekt hatásúak. Ez utóbbiak jelentős endokrin hatásuk folytán a hormonrendszer egyes szintjein negatív visszacsatolási reakciók láncolatán keresztül képesek a kívánt hatás (tumornövekedés gátlás) kifejtésére. Az eredmények alapján elmondható, hogy a GnRH-III szimmetrikus dimerek direkt hatású molekulák előállításának alapját képezhetik, míg a GnRH-III és GnRH-I, illetve GnRH-II származékok aszimmetrikus dimerjei szuperagonista tulajdonságuknál fogva indirekt hatású molekulák alapjául szolgálhatnak.

#### **4.4 Kötődésvizsgálat**

A kötődésvizsgálatokat az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztályán végezték. A vizsgálatokat C26, T47-D és HT-29 xenograftok membránfrakcióján végezték az általam készített tríciummal jelölt GnRH-III és GnRH-II vegyületek felhasználásával (kísérleti rész 5.5 fejezet).

Vizsgálatok alapján a 200-1000-szeres feleslegben adott GnRH-III, a GnRH-II és a humán GnRH-I gátolta a [<sup>3</sup>H]Pro<sup>9</sup>]GnRH-III specifikus kötődését C26 xenograft membránfrakciójában. A kísérletek során a [<sup>3</sup>H]Pro<sup>9</sup>]GnRH-III GnRH-I receptorhoz való specifikus kötődését GnRH-III jelenlétében 100%-nak tekintettük. Ehhez képest a GnRH-I (73%) és GnRH-II (62%) kevésbé gátolta a triciált GnRH-III specifikus kötődését.

Mivel a T-47D xenograftból csak kis tömegű szövetminta állt rendelkezésre, ezért a  $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]\text{GnRH-III}$  specifikus kötődését csak a GnRH-III inhibitor jelenlétében tudták meghatározni.

12. táblázat:  $A [^3\text{H}(\text{Pro}^9)]\text{GnRH-III}$  specifikus kötődése (az eredmények két-két vizsgálat átlagai)

Membránfrakció	Inhibitor	Specifikus kötődés (fmol/ml)	GnRH-I receptor koncentráció (fmol/mg fehérje)
C26 egér vastagbél daganat	GnRH-I	179,9±19,7	96,2±11,4 (73%)
	GnRH-II	174,7±20,1	82,4±10,3 (62%)
	GnRH-III	246,2±35,2	131,7±16,5 (100%)
T-47D humán emlő xenograft	GnRH-III	208,6±23,2	136,3±16,9 (103%)

A vizsgált xenograftokon meghatározott GnRH-I receptor koncentráció a mérés során kapott radioaktivitás különbségéből a tríciummal jelölt GnRH-III specifikus aktivitásának ismeretében (44 Ci/mmol) a membránfehérje koncentrációra vonatkoztatva adható meg. Mindkét tumor esetében közel azonos receptor koncentrációt mértek (12. táblázat).

A fenti tumor szövetmintákban elsőként vizsgálták a  $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]\text{GnRH-II}$  specifikus kötődését. A minták receptor koncentráció értéke jelentős eltérést mutatott. Legmagasabb specifikus kötődést a T-47D emlőtumor esetében tapasztalták. Eredményeink alapján a GnRH-III gátolja a  $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]\text{GnRH-II}$  kötődését (13. táblázat).

13. táblázat:  $A [^3\text{H}(\text{Pro}^9)]\text{GnRH-II}$  specifikus kötődése (az eredmény egy-egy mérés adatát mutatja)

Membránfrakció	Inhibitor	Specifikus kötődés (fmol/ml)	GnRH-I receptor koncentráció (fmol/mg)
HT-29 humán vastagbél xenograft	GnRH-II	376,2	453,3
	GnRH-III	389,2	468,9
T-47D humán emlő xenograft	GnRH-II	727,4	808,2
C26 egér vastagbél daganat	GnRH-I	41,4	29,4
	GnRH-II	117,2	89,5
	GnRH-III	147,1	104,3

Mivel a kötődésvizsgálatokat csak egyszer végezték el, a végső konklúzió levonása előtt a méréseket meg kell ismételni.

#### 4.5 Sejtbejutás vizsgálatok

Munkám célja volt, hogy a natív GnRH-III molekula tumorellenes hatását fokozzam, ezért hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumokat, valamint GnRH-III dimer származékokat állítottam elő. A GnRH származékok receptor mediált endocitózissal képesek bejutni azokba a sejtekbe, melyek rendelkeznek GnRH receptorral<sup>210, 211</sup>, tehát a GnRH

származékok hordozóként szolgálhatnak hatóanyagok célsejtbe történő juttatására<sup>91, 156, 160</sup>. A hatóanyagot nem tartalmazó vegyületek pedig a receptorhoz való kötődés útján tudják elindítani a sejthalálhoz vezető jelátviteli útvonalakat. Ezért vizsgálni kívántam, hogy az általam előállított GnRH-III monomer és dimer származékainak, valamint a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok tumorsejtbe történő kötődését és sejtbejutási képességét. Ennek vizsgálatára alkalmas az áramlási citometria. A mérés során három fő paramétert határoztunk meg. Az FSC-t, amely a sejtek méretével és alakjával, az SSC-t, a sejtek granuláltságával, és a fluoreszcencia intenzitást, mely a felvett fluoreszcens részecskék mennyiségével arányos.

A GnRH-III monomer és szimmetrikus dimer származékok önmagukban nem alkalmasak áramlási citometriás mérésre, mert nem rendelkeznek fluoreszcens sajátossággal, ezért 5(6)-karboxifluoresceinnel jelölt származékaikat állítottam elő. A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok a daunorubicin és doxorubicin fluoreszcens tulajdonsága folytán alkalmasak voltak módosítás nélkül áramlási citometriás mérésre.

Vizsgálataink során letapadó sejtkultúrákkal dolgoztunk (MCF-7, HT-29, C26), melyek nem alkalmasak ilyen formában az áramlási citometriás mérésre. Ezért ezekből a sejtekből a kezelést követően, de még a mérés előtt sejtszuszpenziót kellett készíteni. Ezt kétféle módon valósíthatjuk meg: tripszinnel történő kezeléssel, vagy mechanikus módszerrel (sejtkaparó). A tripszines kezelés során nemcsak a sejteket távolítjuk el a szövettényesztő flakáról, hanem megszüntetjük egyben a sejt-sejt közötti kapcsolatokat, valamint a sejtfelszíni struktúrákat is eltávolítjuk a sejtekről. Ezzel szemben a mechanikus módszer alkalmazásakor a letapadt sejteket felkaparjuk a szövettényesztő flaska aljáról, mely során a sejtfelszíni struktúrák megmaradnak. A két különböző módszer egymás melletti alkalmazása választ adhat arra, hogy az adott vegyület milyen mértékben kötődött csak a sejtfelszíni struktúrákhoz (pl. receptorokhoz vagy aspecifikusan kötődő molekulák) vagy be is jutott-e a sejtbe.

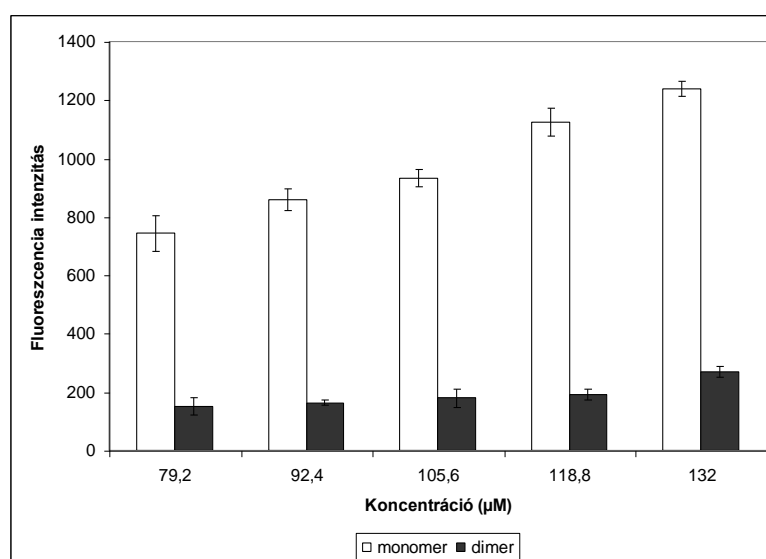
#### **4.5.1 Fluoreszcensen jelölt monomer és szimmetrikus GnRH-III dimer származékok sejtbejutási képességének meghatározása áramlási citometriával**

Ezekhez a vizsgálatokhoz fluoreszcensen jelölt monomer és dimer származékokat állítottam elő, hogy meg tudjuk határozni, illetve össze tudjuk hasonlítani sejtbejutási képességüket. A kísérletekben MCF-7 és HT-29 sejteket használtunk. Mivel ezek a sejtek rendelkeznek sejtfelszíni GnRH-I receptorral, így alkalmasak a GnRH-III molekulák sejtbejutási képességének tanulmányozására.

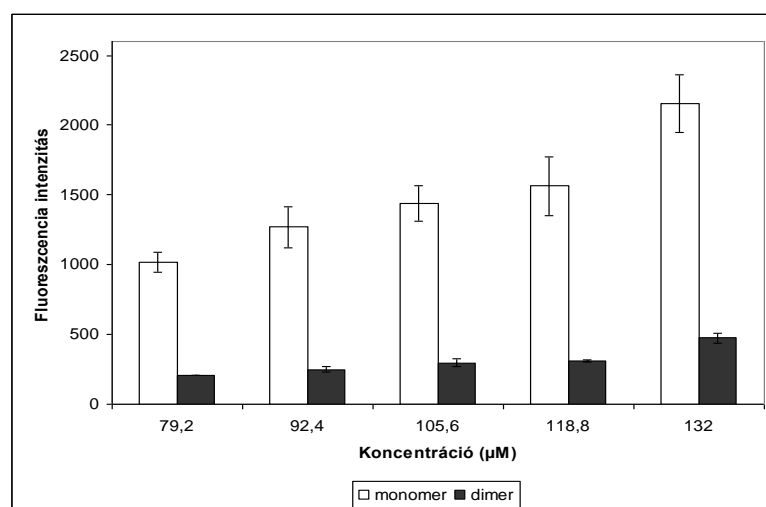
A kísérlet során a kezelt és kezeletlen sejtek fluoreszcencia intenzitás különbségét áramlási citométerrel határoztuk meg. A sejteket a fluoreszcensen jelölt peptid származékokkal (CF-GnRH-III és CF-[GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub>) hat órán át kezeltük, majd a kezelés végén meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást, amely arányos a sejtbejutás mértékével (kísérleti rész 5.6.1 fejezet). Ez azért lehetséges, mert a mérés előtt a letapadó sejteket tripszinnel távolítottuk el az aljzatról, amikor is a sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódott és esetleg aspecifikusan kötődött konjugátumokat is eltávolíthatók, így csak a sejtekbe bejutott anyag fluoreszcencia intenzitását mérjük.

Azt tapasztaltuk, hogy a monomer és dimer egyaránt koncentrációfüggő módon jut be a sejtekbe mindkét sejtípus esetén.

A



B



33. ábra: A fluoreszcensen jelölt GnRH-III monomer és dimer származékának MCF-7 (A) és HT-29 (B) sejtekbe történő bejutási képességének vizsgálata áramlási citométerrel

A leghatékonyabb sejtbejutási képességet 79-132 µM közötti koncentráció

tartományban tapasztaltunk. Az 1  $\mu\text{M}$  alatti koncentrációnál nem láttunk sejtbejutást. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy a molekula fluoreszcenciája 1  $\mu\text{M}$  alatt nem detektálható.

Összehasonlítva a monomer és dimer sejtbejutási készségét elmondható, hogy a monomer hatásosabban (kb. ötszörös mennyiségben) képes bejutni MCF-7 és HT-29 sejtekbe, mint a dimer. Vagyis mindkét sejtípus képes felvenni a dimert, de kevésbé, mint a monomert (33. ábra).

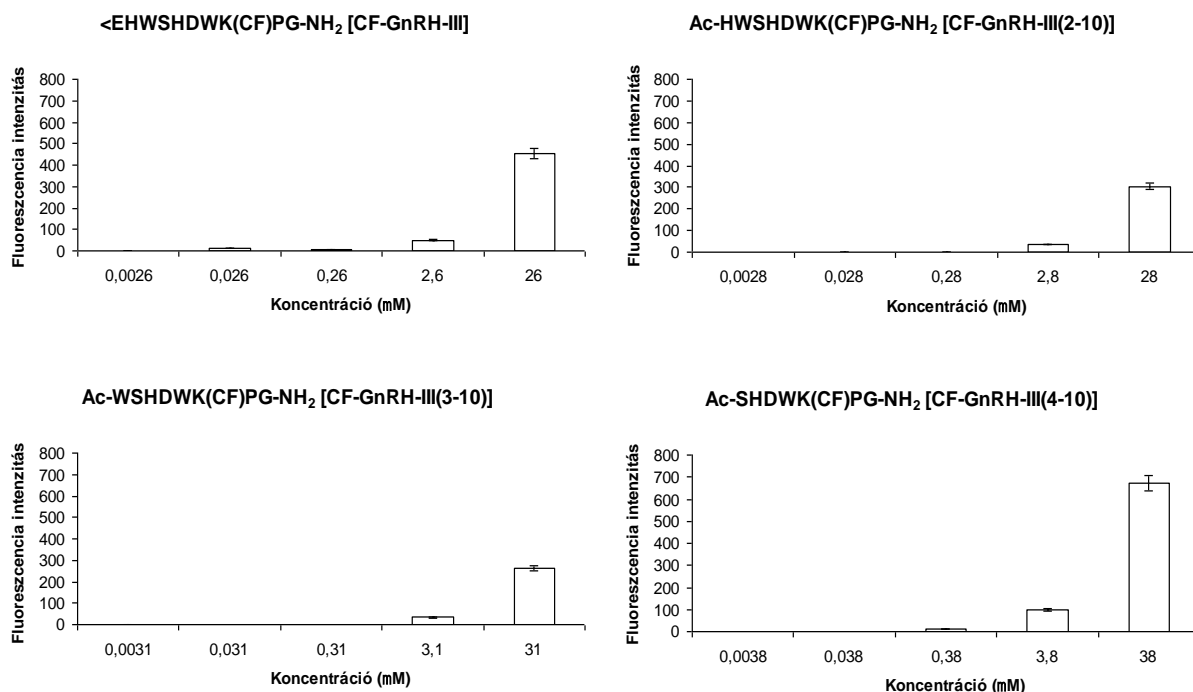
Ha a dimer sejtbejutását hasonlítjuk össze a két sejtvonalon, elmondható, hogy nagyobb mértékű volt HT-29 sejteken, mint az MCF-7 sejtek esetében. A különbség magyarázatát addig nem tudjuk pontosan megadni, amíg nem tudjuk, hogy vajon a sejtbejutásban csak a GnRH-IR, vagy más receptorok is részt vesznek. Minden esetre úgy tűnik, hogy a monomer alkalmasabb lehet hatóanyag szállítására, mert nagyobb mennyiségben tud a sejtekbe jutni. Ugyanakkor mivel a dimerek nagyobb antiproliferatív hatást mutattak (ld. 4.10.1 fejezet, 88. oldal 43. ábra), valószínűsíthetjük, hogy a hatáshoz valóban csak a kötődésre van szükség, a sejtbe jutásra nincs.

#### **4.5.2 Rövidített GnRH-III szekvenciák sejtbejutásának vizsgálata áramlási citometriával**

*Janáky és munkatársai* elkészítették az *N*-terminális felől rövidített GnRH-I peptideket, valamint azok különböző hatóanyagot tartalmazó konjugátumait, amelyek nem rendelkeztek endokrin hatással, mégis képesek voltak tumorelles hatást kiváltó jelátviteli folyamat beindítására, vagyis receptorhoz való kötődési képességük megmaradt<sup>180</sup>.

Ezen irodalmi előzmény alapján megvizsgáltuk a GnRH-III molekulából előállított fragmensek receptorhoz való kötődési és sejtbejutási képességét. A kísérlethez HT-29 sejteket használtunk, melyeket a 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt fragmensekkel kezeltük a peptidek 1 mg/ml-es törzsoldataiból előállított koncentrációsorozattal (GnRH-III:  $2,6 \cdot 10^{-3}$ -26  $\mu\text{M}$ ; GnRH-III(2-10):  $2,8 \cdot 10^{-3}$ -28  $\mu\text{M}$ , GnRH-III(3-10):  $3,1 \cdot 10^{-3}$ -31  $\mu\text{M}$ , GnRH-III(4-10) esetén  $3,8 \cdot 10^{-3}$ -38  $\mu\text{M}$ ). Kontrollként szérumentes médiummal kezelt sejteket alkalmaztunk. A három órás kezelés végén, a sejtek egyik felét sejtkaparóval, míg a másik felét tripszinnel távolítottuk el a lemezről (kísérleti rész 5.6.2 fejezet). Erre azért volt szükség, mert ennek a két módszernek a segítségével meg tudjuk különböztetni a sejtfelszínhez kötött és sejtbe bejutott (sejtkaparási) molekulák összmenyiségét, a kizárólag a sejtben lévő (tripszinnel kezelt) molekulák mennyiségétől. Az eredmények azt mutatták, hogy mind a GnRH-III, mind pedig a fragmens peptidek képesek a sejtbe jutni.

Nem tapasztaltunk jelentős különbséget a natív hormon és a fragmensek sejtbejutásának mértékében. Sejtkaparással (34. ábra) nagyobb fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk (kétszeres), mint tripszines kezeléssel (35. ábra), és ez a különbség szignifikánsnak tekinthető.

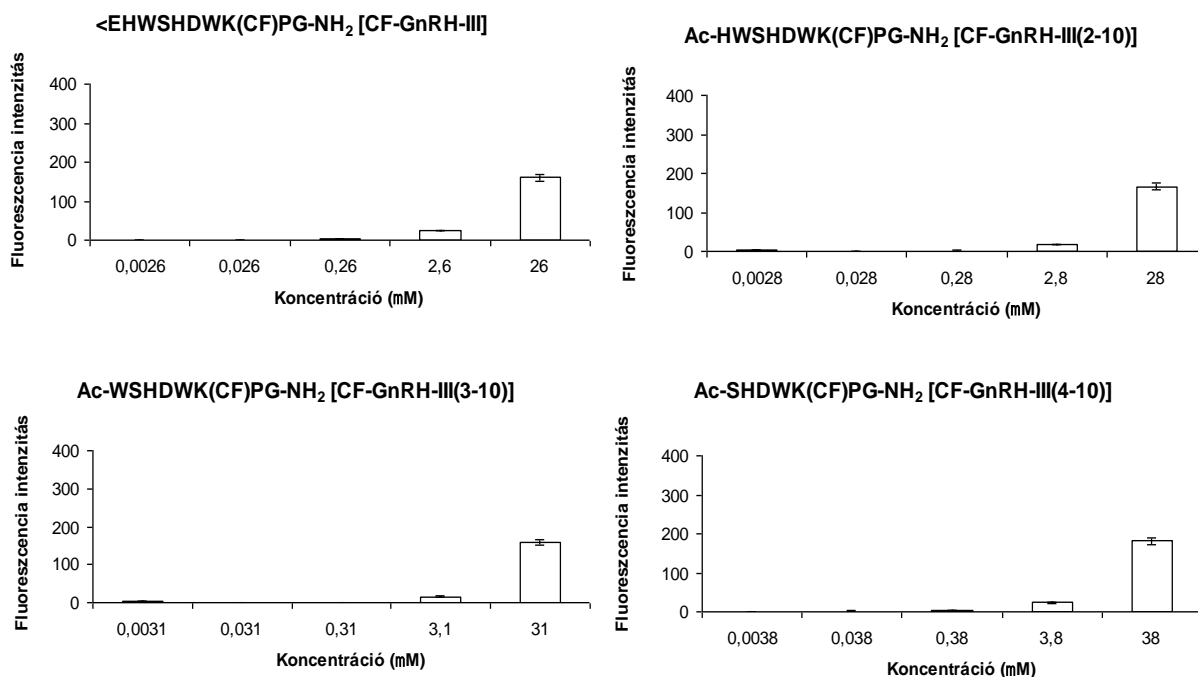


34. ábra: A GnRH-III és az N-terminális felől rövidített származékainak sejt felszínhez kötött és sejtbe jutott mennyiségének meghatározása áramlási citometriával

A két módszer során kapott fluoreszcencia intenzitás különbség azzal magyarázható, hogy a tripszinnel történő kezelés során nemcsak a sejteket távolítja el a szövettényesztő flaskáról, hanem a sejtfelszíni struktúrákat, és ezzel együtt a receptorhoz kötött és aspecifikusan kötődő konjugátumokat is. A sejtfelszíni aspecifikus és receptor kötött jelzett molekulák megkülönböztetése még további kísérleteket igényel, amelyek folyamatban vannak.



Ezzel ellentétben a sejtkaparóval történő sejtszuszpenzió készítésekor csak a sejtek és a szövettenyésztő flaska között kialakult kapcsolatot szüntetik meg, a sejtfelszínhez specifikusan, illetve aspecifikusan kötött molekulák és a sejtfelszíni struktúrák változatlanok maradnak. A koncentráció növelésével minden fragmens esetén nő a sejtbejutás mértéke.



35. ábra: A GnRH-III és az N-terminális felől rövidített származékainak kizárólag a sejtekben lévő mennyiségének meghatározása áramlási citometriával

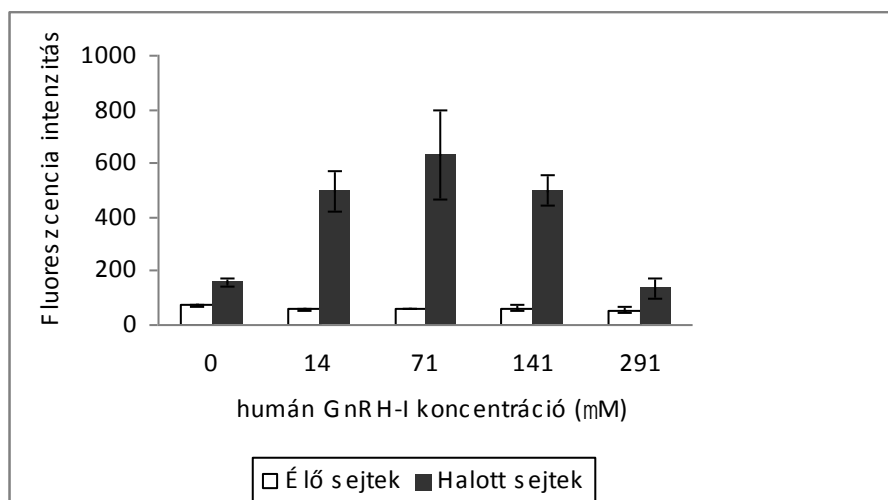
A kapott adatok arra engednek következtetni, hogy a fragmens peptidek képesek voltak bejutni a HT-29 sejtekbe feltehetően receptor mediált endocitózissal. Melynek igazolása további vizsgálatokat igényel.

#### 4.5.3 A humán GnRH-I hatása a fluoreszcensen jelölt GnRH-III monomer és dimer származékainak sejtbejutására

A humán GnRH-I peptiddel való előkezelés célja az volt, hogy tanulmányozzuk, hatással van-e a GnRH-III monomer, illetve szimmetrikus dimer ([GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub>) származékainak sejtbejutására. A kompetíciós vizsgálatokban MCF-7, HT-29 és C26 sejteket használtunk. A monomer származék esetén mindhárom sejtvonalon megvizsgáltuk a humán GnRH-I hatását, míg a szimmetrikus dimer esetén csak MCF-7 sejteket tanulmányoztunk. Mindkét származék kompetíciós vizsgálatában előkezeltük a sejteket humán GnRH-I 5 mg/ml-es törzsoldatából készített különböző koncentrációjú oldataival vagy szérummentes médiummal (negatív kontrol) 30 percig. Az előkezelt és a negatív kontrol sejtjeihez adtuk az

5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt GnRH-III (CF-GnRH-III) 1 mg/ml (12  $\mu$ M), illetve CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> 0,5 mg/ml-es (10  $\mu$ M) koncentrációjú oldatait és további hat órán keresztül inkubáltuk azokat (kísérleti rész 5.6.3 fejezet). A dimer esetében 1 mg/ml (20  $\mu$ M) és 0,2 mg/ml (4  $\mu$ M) oldatokkal is elvégeztük a méréseket. A dimer 1 és 0,2 mg/ml koncentrációjánál nem tapasztaltunk hatást. GnRH-típusú vegyületeknél MALDI-MS-sel kimutathatók nemkovalens asszociátumok, melyből az következik, hogy ezek a vegyületek aggregátumokat képeznek. Ezért a nagyobb koncentráció esetében valószínűleg nagyobb az aggregáció mértéke, ezért nem tudnak kötődni a receptorokhoz. A 0,2 mg/ml-es koncentráció valószínűleg már túl alacsony ahhoz, hogy detektálni tudjuk a sejtbejutást. Optimális hatást 0,5 mg/ml-es koncentráció mellett kaptunk, ezért alkalmaztuk ezt a koncentrációt a dimerrel végzett méréseink során. Hat óra elteltével vizsgáltuk az előkezelés hatását a monomer és dimer konjugátumok sejtbejutási képességére.

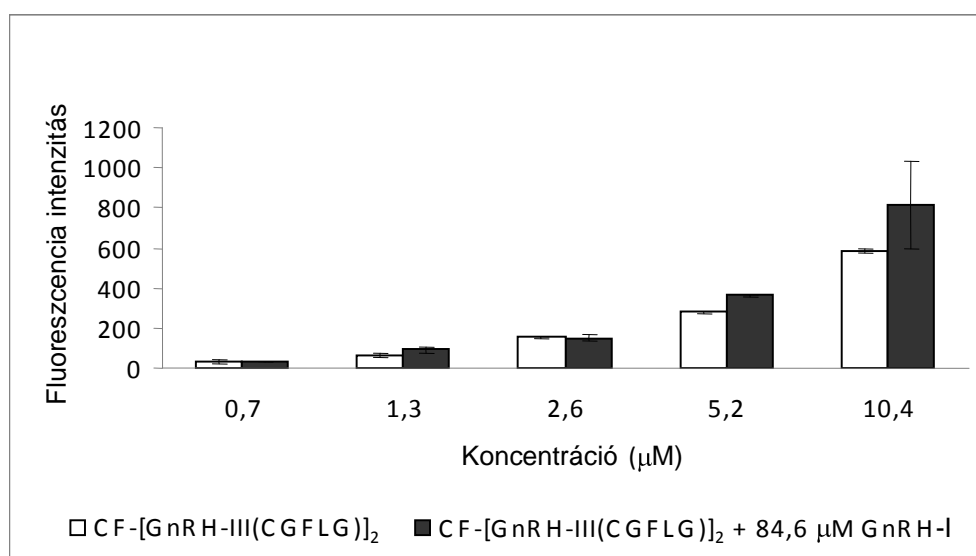
A mért adatok alapján elmondható, hogy a humán GnRH-I molekulával történő előkezelés módosítja a monomer sejtbejutását. MCF-7 sejtek esetében nem tapasztaltunk egyik koncentrációban sem felvételnövekedést. A populációk hisztogramjainak analízise meglepő eredményt adott. Az élő sejtek összfluoreszcencia intenzitása nem változott a kezelési koncentrációval. Viszont a halott sejtpopulációban a hisztogramok nagyfokú fluoreszcencia változást mutattak. Valószínűsíthetjük, hogy a GnRH-I molekulával történő előkezelés hatására a sejtek monomer felvétele nő, és ettől el is pusztulnak. Természetesen kijelentésünket a későbbiekben mechanizmus vizsgálatokkal fogjuk alátámasztani. Maximális serkentő hatást 71  $\mu$ M esetén tapasztaltunk, annál nagyobb koncentráció már gátlólag hatott a CF-GnRH-III monomer származék sejtek általi felvételére (36. ábra).



36. ábra: A humán GnRH-I hatásának tanulmányozása a GnRH-III(CF) MCF-7 sejtek általi felvételére áramlási citometriával

Valószínűsíthető, hogy 71  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb koncentrációjú GnRH-I jelenléte receptor downregulációt eredményez, míg az alatti mennyiségben fokozza a receptorok expresszióját. C26 sejtek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a monomer bejutását 71  $\mu\text{M}$  GnRH-I jelenléte nem befolyásolta, viszont ennél alacsonyabb (14,4  $\mu\text{M}$ : 51%), illetve magasabb (141  $\mu\text{M}$ : 42%) koncentrációban gátlólag hatott a sejtfelvételre.

Hasonló eredményt kaptunk MCF-7 sejteken a dimer bejutásának vizsgálatakor is. Ebben az esetben a GnRH-I előinkubálás kisebb mértékben, de fokozta a dimer sejtek általi felvételét (37. ábra).



37. ábra: A humán GnRH-I hatásának tanulmányozása a CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> MCF-7 sejtek általi felvételére áramlási citometriával

#### 4.5.4 A [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> hatása a fluoreszcensen jelölt [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> sejtbefutására

A humán GnRH-I peptiddel végzett kompetíciós vizsgálatokhoz hasonlóan az MCF-7 sejteket előkezeltük acetilcsoportot nem tartalmazó dimerrel ([GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub>) 2,5 mg/ml-es törzsoldatából különböző mennyiséget (12, 24, 36 és 48  $\mu\text{M}$ ) véve, vagy szérumentes médiummal (negatív kontrol) 30 percig. Az előkezelt és a negatív kontrol sejtheihez adtuk az 5(6)-karboxifluoreszceinnel jelölt GnRH-III dimer (CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub>) 3,5  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatait, melyeket a sejteknek megfelelő szérumentes médiumban oldottunk fel. Hat óra elteltével vizsgáltuk az előkezelés hatását a konjugátumok sejtbefutási képességére (kísérleti rész 5.6.4 fejezet).

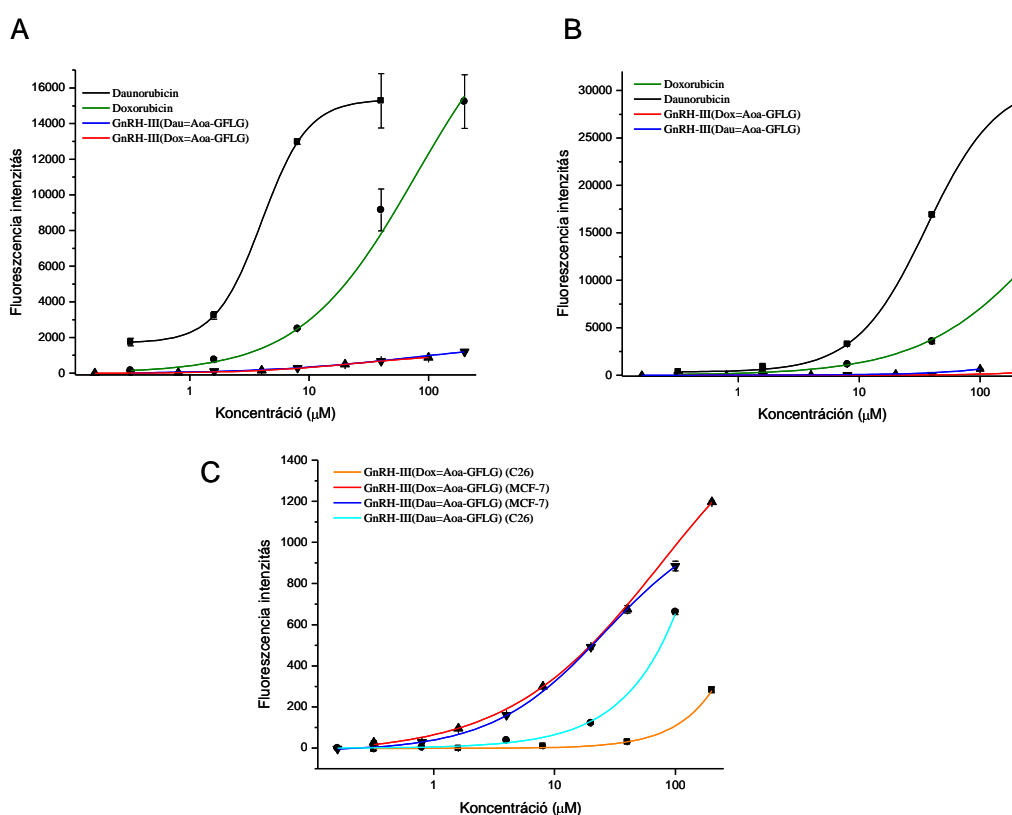
A mért adatok azt mutatták, hogy a szimmetrikus [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> dimerrel való előkezelés gátolta a jelölt forma sejtbefutását. A koncentráció emelésével nem változott

jelentősen ez a gátló hatás (12  $\mu\text{M}$ : 59%-; 24  $\mu\text{M}$ : 55%-; 36  $\mu\text{M}$ : 50%- és 48  $\mu\text{M}$ : 60% -kal csökkent a fluoreszcensen jelölt dimer származék sejtbe jutott mennyisége).

A dimerrel való előkezelés során nem tapasztaltunk a humán GnRH-I peptiddel történő előkezeléshez hasonló fokozódó sejtbejutási képességet a koncentráció emelésével. Ez arra enged következtetni, hogy a dimer a kezelés során a receptorhoz kötődik, de nem képes receptor expressziót indukálni.

#### 4.5.5 Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok sejtek által történő felvétele

A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumokkal való kezelés során hasonlóan jártunk el, mint a szimmetrikus dimerek sejtfelvételi vizsgálatainál. A kísérletek során MCF-7 és C26 sejteket használtunk. Az előállított konjugátumok közül csak az oximkötést tartalmazó konjugátumokat vizsgáltuk, mert ezek *in vivo* tumorelles hatását kívántuk vizsgálni. A vegyületeket megfelelő szérumbmentes médiumban oldottunk fel. A sejtbejutási vizsgálatokhoz a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot  $2,5 \cdot 10^{-4}$ -100  $\mu\text{M}$  koncentráció tartományban, míg a GnRH-III(Dox=Aoa-GFLG) konjugátumot  $2,5 \cdot 10^{-4}$ -200  $\mu\text{M}$  között alkalmaztuk.



38. ábra: A Dau és Dox szabad hatóanyagok, valamint a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok sejtbejutási képességének meghatározása áramlási citométerrel

Kontrollként szérummentes médiummal kezelt sejteket használtunk (kísérleti rész 5.6.5 fejezet).

Vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk a szabad hatóanyagok sejtbejutási képességét a konjugátumokéval. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét konjugátum koncentrációfüggő módon képes bejutni a sejtekbe, viszont sokkal kisebb mértékben (38.A, B és C ábra), mint a szabad hatóanyagok. Elmondható továbbá, hogy az MCF-7 sejtek jobban képesek felvenni a konjugátumokat, mint a C26 sejtek (37.C ábra). Míg az MCF-7 sejteken nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Dau és Dox konjugátumok sejtbejutási képességében, addig C26 sejtekbe a daunorubicin tartalmú konjugátum jobban bejutott, mint a Dox variáns (38.C ábra). Ez az eredmény magyarázatot adhat az *in vitro* citosztatikus hatás mérési eredményeire (ld. 83. oldal, 4.8. fejezet, 15. táblázat) <sup>203</sup>.

#### **4.6 Hatóanyagot tartalmazó konjugátumok DNS-hez való kötődésének vizsgálata fluoreszcens spektroszkópiai módszerrel**

Annak érdekében, hogy a sejtfelvételi adatokat értelmezni tudjuk, vizsgáltuk a daunorubicin, a Dau=Aoa-OH és az oximkötésű GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum fluoreszcencia intenzitását DNS (pmCherry-C1, plazmid DNS, emlős expressziós vektor, Clontech) jelenlétében, illetve anélkül. A mérésekre azért volt szükség, mert a szabad daunorubicin és a konjugátum fluoreszcenciája jelentősen eltérhet egymástól, így a sejtfelvételi vizsgálatokban mért adatok nem mutatják egyértelműen a sejtbe jutott daunorubicin és konjugátum relatív mennyiségét. A fluoreszcencia intenzitást befolyásolja az is, hogy a sejtbe jutott Dau vagy konjugátum kötődik-e a DNS-hez. A DNS-hez való kötődés csökkenti a vegyület fluoreszcencia intenzitását (kísérleti rész 5.7 fejezet).

Minden vizsgált vegyület emissziós maximuma 555 nm-en volt ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ ). A mért relatív fluoreszcencia intenzitásokat ezen a hullámhosszon a 12. táblázat foglalja össze.

DNS-sel való kölcsönhatási reakció során fluoreszcencia intenzitás csökkenést tapasztaltunk a daunorubicin és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum esetén egyaránt. Mindkét esetben az emissziós maximumon (555 nm) mért kezdeti fluoreszcencia intenzitás közel a felére csökkent. (Dau+DNS/DNS nélkül hányados: 0,563; GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)+DNS/DNS nélkül: 0,534). A kapott spektrumok arra engednek következtetni, hogy a szabad hatóanyag és a hatóanyagot tartalmazó konjugátum DNS-sel való kölcsönhatásának erőssége hasonló.

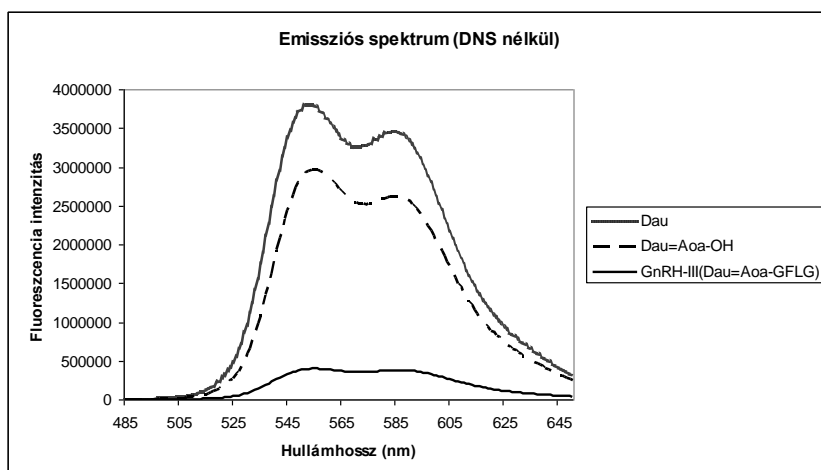
A  $\text{Dau}=\text{Aoa-OH}+\text{DNS}$ / DNS nélkül hányadosa magasabb (0,855), mint a szabad hatóanyag és a konjugátum esetén, mely gyengébb kölcsönhatásra utal (14. táblázat).

14. táblázat: A daunorubicin,  $\text{Dau}=\text{Aoa-OH}$  és a  $\text{GnRH-III}(\text{Dau}=\text{Aoa-GFLG})$  fluoreszcencia intenzitásai 555 nm-en ( $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ )

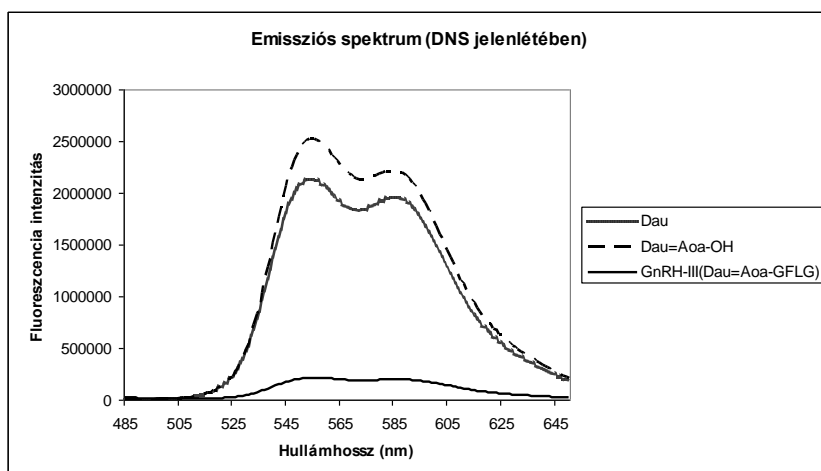
$\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$ ; koncentráció: $10 \mu\text{M}$	DNS nélkül	DNS mellett	DNS/DNS nélkül
Dau	3780000	2130000	0,563
$\text{Dau}=\text{Aoa-OH}$	2960000	2530000	0,855
$\text{GnRH-III}(\text{Dau}=\text{Aoa-GFLG})$	397000	212000	0,534

Fluoreszcencia méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a konjugátum fluoreszcenciája körülbelül tízszer alacsonyabb, mint a daunorubiciné (39. A és B ábra). Ez a különbség az áramlási citometriás mérésekben jóval nagyobbak bizonyult (több mint 75-szörös C26 sejtek esetén és 68-szoros MCF-7 sejteken a vegyületek  $10\mu\text{M}$ -os koncentrációjában) (38. ábra).

A



B



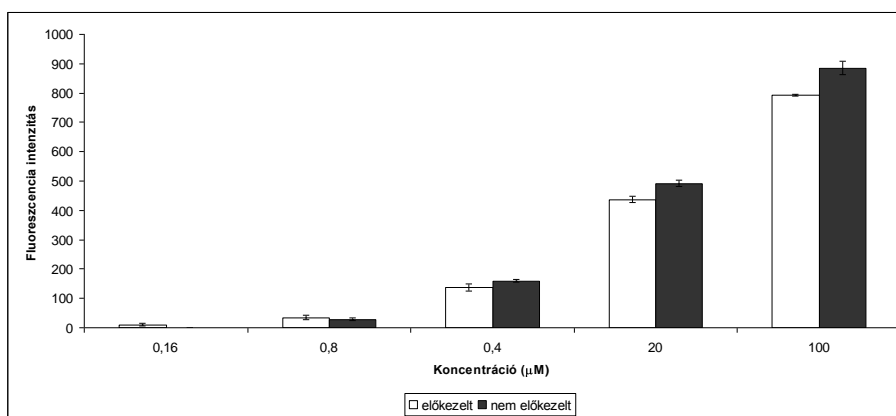
39. ábra: A daunorubicin,  $\text{Dau}=\text{Aoa-OH}$  és a  $\text{GnRH-III}(\text{Dau}=\text{Aoa-GFLG})$  emissziós spektrumai A) DNS nélkül, illetve B) DNS jelenlétében

Ezek az adatok alátámasztják feltételezéseinket, miszerint a konjugátum nem jut be olyan hatékonyan a sejtekbe, mint a szabad hatóanyag molekula<sup>203</sup>.

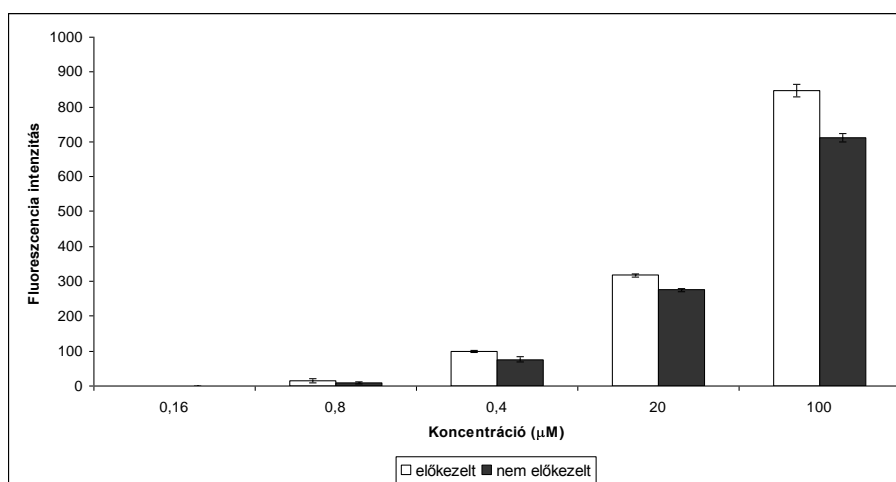
#### 4.7 A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) sejtbejutásának vizsgálata GnRH-I receptor elleni ellenanyaggal, illetve GnRH-I agonistával ([D-Trp<sup>6</sup>]GnRH-I)

A GnRH-III képes kötődni a GnRH-I és a GnRH-II receptorhoz is. MCF-7 és C26 tumor sejtvonalakon az Országos Onkológiai Intézetben kimutatták GnRH-I receptorok jelenlétét. Irodalmi adat szerint olyan endometrium- és petefészek daganatsejtek esetében, melyeknél a GnRH-I receptor génjét eltávolították (GnRH-I receptor „knock-out”), a GnRH-I agonista triptorelin ([D-Trp<sup>6</sup>]-GnRH-I) antiproliferatív hatása megszűnt, míg a GnRH-I antagonistá Cetorelix és a GnRH-II molekulák növekedésgátló hatása megmaradt<sup>102</sup>.

A  
(63  $\mu$ M)



B  
(450  $\mu$ M)



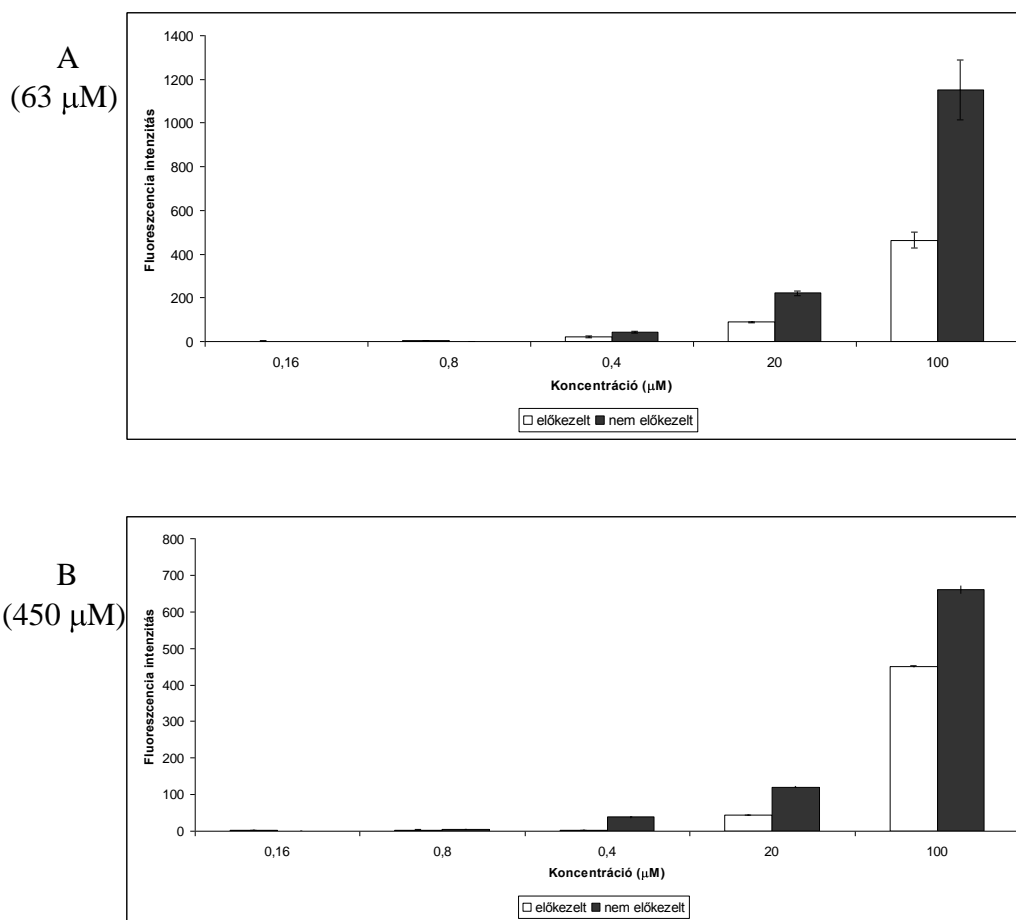
40. ábra: A triptorelin hatásának vizsgálata a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) MCF-7 sejtekbe jutására áramlási citometriával [A) 63  $\mu$ M; B) 450  $\mu$ M]

Annak érdekében, hogy kiderítsük, vajon a GnRH-I receptor játszik-e fontos szerepet a GnRH-III származékok sejtbejutásában és tumorelles hatásuk folyamataiban, triptorelin,

illetve GnRH-I receptor elleni ellenanyagot alkalmaztunk a receptor blokkolására. A tumorsejteket fél órán át előkezeltük triptorelinnel két koncentrációt alkalmazva (63  $\mu\text{M}$  vagy 450  $\mu\text{M}$ ) (kísérleti rész 5.8 fejezet).

Az előkezelést követően a hatóanyagot tartalmazó konjugátumot (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)) adtuk a sejtekhez  $2,5 \cdot 10^{-4}$ -100  $\mu\text{M}$  koncentráció tartományban. A triptorelin nem gátolta jelentősen a konjugátumok sejtbejutását MCF-7 sejteken (40. A és B ábra), sőt nagyobb koncentrációban még inkább növelte a sejtfelvételt<sup>204</sup>.

Ezzel ellentétben C26 sejteken a konjugátum felvétele szignifikánsan csökkent triptorelin hatására (41. A és B ábra).



41. ábra: A triptorelin hatásának vizsgálata a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) C26 sejtek általi felvételére áramlási citometriával [A: 63  $\mu\text{M}$ ; B: 450  $\mu\text{M}$ ]

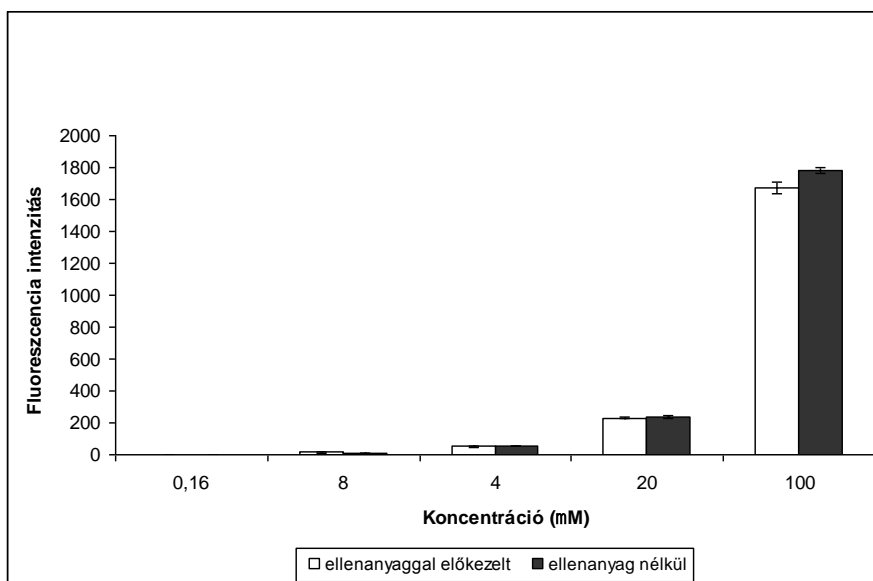
Érdekes módon alacsonyabb triptorelin koncentráció eredményezett magasabb gátló hatást (~13% gátlás MCF-7 tumor sejteken és ~60% gátlás C26 tumor sejteken). A C26 sejteken tapasztalt magasabb gátló hatás magyarázható azzal, hogy ezeken a sejteken kevesebb GnRH-I receptor van, mint az MCF-7 sejteken. A magas triptorelin koncentráció serkentőleg hatott a konjugátum sejtbejutására, melynek az lehet a magyarázata, hogy



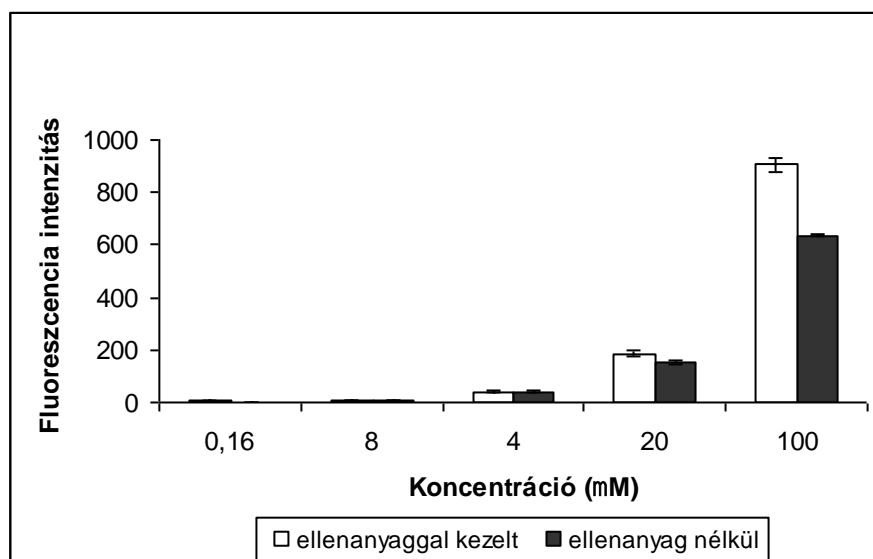
receptor expressziót indukál a sejtfelszínen. Mint korábban láttuk, ez a feltételezett receptor expresszió növekedés jelentősebb volt MCF-7 sejteken GnRH-I hatására is.

A triptorelinhez hasonlóan a GnRH-I receptor elleni ellenanyaggal (1,2 µg/ml) való előkezelés (kísérleti rész 5.8 fejezet) hatására MCF-7 sejtekben a konjugátum felvétele nem gátlódott. Azonban C26 sejtek esetében a konjugátum fokozottabb mértékben jutott be a sejtekbe, főleg a legnagyobb koncentráció esetén, az ellenanyaggal való kezelés hatására (42. ábra)<sup>204</sup>.

A



B



42. ábra A GnRH-I receptor elleni ellenanyag hatásának tanulmányozása GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) MCF-7 (A) és C26 (B) sejtek általi felvételére áramlási citometriával

A fent említett eredmények alapján elmondható, hogy MCF-7 sejtek esetében az

alacsonyabb koncentrációban (63  $\mu\text{M}$ ) alkalmazott triptorelinnel és az ellenanyaggal való előkezelés egyaránt kismértékű gátló hatást eredményezett a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum sejtbejutására. Magasabb triptorelin koncentráció viszont fokozta a konjugátum sejtek által történő felvételét. Ennek magyarázatához további kísérletek szükségesek. C26 sejtek esetében a triptorelin mindkét koncentrációban jelentős gátló hatást okozott a konjugátum sejtbejutását tekintve. A két koncentráció közül érdekes módon az alacsonyabb triptorelin koncentráció okozott fokozottabb gátló hatást. A GnRH-I receptor elleni ellenanyaggal való előkezelés a triptorelinnel ellentétben nem gátolta, hanem fokozta a konjugátum C26 sejtek általi felvételét. Lehetséges, hogy az alkalmazott ellenanyag koncentráció nem volt elegendő a receptor teljes blokkolásához. Ezért mindenképpen meg kell ismételni a kísérleteket magasabb GnRH-I receptor elleni ellenanyag koncentráció mellett is, hogy pontosabb képet kapjunk a sejtbejutási-, illetve hatásmechanizmusról. A két kísérlet során kapott adatok alapján egyértelmű magyarázatot nem tudunk arra adni, hogy valójában melyik GnRH receptor játszik szerepet a GnRH-III konjugátum sejtbejutásakor. Elképzelhető, hogy nemcsak GnRH receptorok, hanem növekedési faktorok receptora(i) is szerepet játszhatnak az internalizációs folyamatokban. Ennek igazolásához további vizsgálatok elvégzése szükséges.

#### **4.8 Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása MTT-teszttel**

Tizenkét antraciklin hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze MCF-7, C26 és HT-29 sejteken MTT-teszt segítségével. Vizsgáltuk egyrészt a daunorubicint és doxorubicint tartalmazó konjugátumok közti hatáskülönbséget, másrészt a hatóanyag-GnRH-III közti különböző kötéstípus hatását a citosztatikus hatásra. Továbbá az általunk előállított GnRH-III konjugátumok hatásosságát hasonlítottuk össze a klinika III vizsgálatban lévő AN-152 konjugátummal.

A konjugátumokat  $5,1 \cdot 10^{-4}$ -100  $\mu\text{M}$  koncentráció tartományban vizsgáltuk. A konjugátumokkal való hat órás inkubálást követően a sejteket 72 órán át 37°C-on tartottuk, és meghatároztuk az élő sejtek arányát MTT-teszt segítségével. Koncentrációnként négy párhuzamos mérést végeztünk, és minden mérést kétszer ismételtünk meg (kísérleti rész 5.9 fejezet). A mért eredmények alapján elmondható, hogy a szabad hatóanyag mindkét citosztatikum esetében hatásosabb volt, mint a konjugátumok bármelyike mind MCF-7 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,1-0,3  $\mu\text{M}$ ), mind, pedig HT-29 és C26 ( $\text{IC}_{50}$ : 1-5  $\mu\text{M}$ ) sejteken.

A konjugátumok közül az észterkötést tartalmazók voltak a leghatékonyabbak mindhárom sejtvonalon. A hatás ebben az esetben megközelítette a szabad hatóanyag citosztatikus hatását. Ez azzal magyarázható, hogy ebből a konjugátumból képes legkönnyebben felszabadulni az eredeti hatóanyag, hiszen a sejtekben jelenlévő észterázok hasítják a hatóanyag és peptid közti kötést. Fontos megjegyezni, hogy a kísérleteket szérumentes médiumban végeztük, ugyanis a szérumtartalmú médiumban jelen lehetnek észterázok<sup>220</sup>, melyek még a sejten kívül hasítanák az észterkötést, ezáltal nem célzottan, receptor mediált endocitózissal, hanem diffúzióval jutna a sejtekbe a hatóanyag.

15. táblázat: A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása MTT-teszt segítségével

	AN-152 észter	Dox- GnRH-III észter	Dox- GnRH-III GFLG észter	Dau- GnRH-III hidrazon	Dau- GnRH-I oxim	Dau- GnRH-III oxim	Dau- GnRH-III GFLG oxim	Dox- GnRH-III GFLG oxim	Dau- GnRH-III amid	Dox- GnRH-III amid	Dau- GnRH-III GFLG amid	Dox- GnRH-III GFLG amid
MCF-7	0,2 ±0,1	0,5 ±0,3	0,2 ±0,1	1,5 ±0,2	4,1 ±0,1	2,2 ±1,1	3,9 ±1,2	5,4 ±1,9	>100	>100	99,7 ±4,8	84,2 ±5,5
C26	n.t.	4,8 ±0,1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	22,5 ±1,7	46,1 ±6,1	>100	>100	>100	>100
HT-29	1,1 ±0,4	5,7 ±0,4	3,2 ±0,2	n.t.	20,1 ±6,0	14,2 ±3,2	19,4 ±3,1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

A Dau és Dox IC<sub>50</sub> értékei: MCF-7 sejteken: 0,1-0,3 µM

C26 és HT-29 sejteken: 1-5 µM

Az észterkötésű konjugátumok közül az AN-152 és a távtartó szekvenciával rendelkező GnRH-III konjugátum hatása megegyező volt MCF-7 sejteken, míg HT-29 sejteken az AN-152 jobbnak bizonyult. A citosztatikus hatás szempontjából hatékonyak voltak a hidrazon- és oximkötésű konjugátumok is. Az amidkötést tartalmazó származékok bizonyultak a legkevésbé hatásosnak. Az amid- és oximkötésű molekulákból előállítottam daunorubicin és doxorubicin tartalmú származékot, hogy összehasonlítsam a két citosztatikum hatását. Továbbá az amidkötésű konjugátumokból előállítottam enzimlabilis szekvenciát tartalmazó, illetve nélküli struktúrákat is, hogy megvizsgáljuk a távtartó szerepét a sejtbejutásra, illetve a hatásra. Valamint kontrollként előállítottam GnRH-I konjugátumot is, melyben a daunorubicin oximkötéssel kapcsolódik a GnRH-I molekulához. Ez a vegyület nem volt hatásosabb egyik oximkötésű, daunorubicint tartalmazó GnRH-III konjugátumnál sem. Az oximkötésű konjugátumok esetén a daunorubicin tartalmú konjugátum bizonyult hatásosabbnak MCF-7 és C26 sejteken egyaránt. A sejtbejutási adatokkal összevetve, hasonló eredményt kaptunk. Így MCF-7 sejteken nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a Dau és

Dox alkalmazása esetén, míg C26 sejteken jelentős különbség tapasztalható a két hatóanyag között. Ebben az esetben a GFLG spacer jelenlétét nemhogy fokozta, de inkább kissé csökkentette a konjugátum citosztatikus hatását. Az amidkötésűek esetén MCF-7 sejteken a doxorubicin tartalmú bizonyult hatásosabbnak, C26 sejteken nem tudjuk meghatározni, hogy volt-e különbség, mert a vizsgált koncentrációtartomány felett volt a konjugátumok IC<sub>50</sub> értéke. Az adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a távtartónak valószínűleg nincs citosztatikus hatást befolyásoló szerepe MCF-7 és C26 sejteken<sup>204, 203</sup> (15. táblázat).

#### **4.9 A GnRH-III dimer, és az azokat alkotó monomer származékok apoptotikus hatásának meghatározása áramlási citometriával**

A GnRH származékok apoptotikus hatását az irodalom is említi. Bár a GnRH-I és GnRH-II származékok apoptózisra való készsége nem egyértelmű, antiproliferatív hatásukhoz hasonlóan sejtfüggő. A GnRH-I agonisták (pl triptorelin) meggátolják az apoptotikus folyamatok beindulását megvédve ezáltal a sejteket a programozott sejthaláltól<sup>142</sup>. A GnRH-II antagonisták viszont ovárium és endometrium tumorsejtvonalakon apoptózist indukálnak koncentrációfüggő módon, a caspase-3 aktivációján, valamint a sejtosztódás gátlásán keresztül<sup>129</sup>. Egy másik tanulmány a GnRH-II agonisták által kiváltott apoptotikus hatást vizsgálta GnRH-IR negatív, de GnRH-IIR pozitív ovárium tumorsejtvonalon (SK-OV-3)<sup>151</sup>. Továbbá daganatsejt pusztulás váltható ki feltételezett apoptotikus folyamaton keresztül *in vitro*, ha magas koncentrációban alkalmazzuk a triptorelix-1 GnRH-II antagonistá származékot, viszont ez a hatás elmarad, ha ugyanilyen körülmények között a GnRH-I antagonistá Cetorelixet alkalmazzuk. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a GnRH-II receptorok szerepet játszanak ebben a mechanizmusban. A GnRH-II antagonisták által kiváltott apoptózis pontos mechanizmusa és az, hogy ez a hatás GnRH-I vagy GnRH-II receptoron keresztül valósul meg, még nem ismert.

Az általam előállított szimmetrikus és aszimmetrikus dimerek különböző GnRH származékokból épülnek fel. Az irodalmi adatok alapján vizsgálni kívántam, hogy képesek-e apoptózis kiváltására.

A GnRH-III szimmetrikus és aszimmetrikus dimer, illetve az azokat alkotó monomer GnRH származékok apoptotikus hatását MCF-7 és HT-29 sejteken vizsgáltuk. A dimerek és alkotóelemeik korai apoptotikus hatását fluoreszcensen jelölt annexin-V (FITC-annexin-V) molekula alkalmazásával határoztuk meg. Apoptózis során számos változás lép fel a sejt struktúrában. Egyik legjellemzőbb ezek közül a membrán foszfolipid aszimmetriájának

elvesztése, amely a foszfatidilszerin foszfolipid kettős réteg citoplazma felőli felszínéről az extracelluláris tér felé történő áthelyeződésével jön létre<sup>212</sup>. Az annexin-V (36 kDa) a kalciumfüggő foszfolipidet kötő annexinek családjába tartozik, mely nagy affinitással képes kötődni a foszfatidilszerinhez<sup>213</sup>. Amennyiben a foszfatidilszerin áthelyeződik a kettősréteg külső, extracelluláris felszínére, az annexin-V nagy affinitással (7 nM) kötődik hozzá. Ezek alapján az annexin-V fluoreszcensen jelölt származékával követhetjük a membrán foszfolipid aszimmetriájában bekövetkező változásokat<sup>212</sup>. Minthogy a halott sejtek populációját apoptotikus és nekrotikus sejtek alkotják, ezt a két populációt el kellett különítenünk egymástól annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni a dimerek, és az őket alkotó GnRH monomer származékok képesek-e apoptózis kiváltására. Erre szolgált a propídium-jodid, amely bejut a nekrotikus és apoptotikus sejtekbe egyaránt, míg a FITC-annexin-V csak a korai apoptotikus sejtek membránjához kötötten található meg.

A sejteket a dimer- és az azokat alkotó monomer GnRH származékokkal hat órán át kezeltük, majd a kezelés végén megjelöltük azokat FITC-annexin-V oldatával és meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitást. Ezt követően minden mintához propídium-jodidot adtunk és ismét megmértük a fluoreszcencia intenzitást (kísérleti rész 5.10 fejezet).

A dimereket alkotó monomer GnRH származékok esetében az irodalmi adatokkal megegyező eredményt kaptunk, miszerint a GnRH-I agonista analógok ( $[D-Cys^6]$ GnRH-I és a  $[D-Lys^6]$ GnRH-I) nem, vagy csak csekély mértékben váltottak ki apoptotikus hatást MCF-7 sejteken. A GnRH-II agonista származék ( $[D-Cys^6]$ GnRH-II) viszont már apoptotikus hatást mutatott MCF-7 sejteken. Apoptózis szempontjából a GnRH-III, valamint az oldalláncban enzimlabilis távtartó szekvenciát tartalmazó származéka (GnRH-III(Ac-CGFLG)) bizonyult a monomerek közül a leghatásosabbnak.

A vizsgált aszimmetrikus dimerek mindegyike apoptózist váltott ki MCF-7 sejteken. Az SzI-2 dimer a GnRH-III apoptotikus hatásával volt azonos, vagyis elmondható, hogy ebben az esetben a GnRH-III határozta meg a molekula apoptotikus tulajdonságát, mert a másik alkotóelem ( $[D-Cys^6]$ GnRH-I) nem váltott ki apoptotikus hatást önmagában. Az SzI-4, amely  $[D-Cys^6]$ GnRH-II és GnRH-III analógokból épül fel, rendelkezett a legmagasabb apoptotikus hatással. Vagyis a két származék apoptotikus hatása ebben az esetben összeadódott, additív módon viselkedett a két komponens a végső hatás kialakítása szempontjából. A harmadik vizsgált aszimmetrikus dimer (SzI-6: GnRH-III(Ac-C)- $[D-Lys^6]$ GnRH-I(-CH<sub>2</sub>CO-GFLG)) hasonló eredményt mutatott, mint az SzI-4. Ebben az esetben is a két komponens additív hatásáról beszélhetünk.

Meglepő módon a szimmetrikus dimerek közül egyiknek sem volt apoptotikus hatása

ezen a sejteken, noha a monomerek közül a GnRH-III(Ac-CGFLG) rendelkezett a legmagasabb apoptotikus hatással.

A HT-29 sejteken sem a dimereket alkotó monomer GnRH származékok, sem pedig a dimerek nem váltottak ki korai apoptózist (16. táblázat).

16. táblázat: A GnRH-III dimerek korai apoptotikus hatásának meghatározása MCF-7 és HT-29 sejteken áramlási citométerrel

GnRH származékok (koncentráció: 10 $\mu$ M)	MCF-7	HT-29
	Halott sejtek (%)	
[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)
[D-Lys <sup>6</sup> ]GnRH-I	5,7	
[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	11,8	
GnRH-III	17,7	
GnRH-III(Ac-CGFLG)	18,9	
SzI-2	17,1	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)
SzI-4	26,7	
SzI-6	22,5	
[GnRH-III(CGFLG)] <sub>2</sub>	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)
[GnRH-III(AC-CGFLG)] <sub>2</sub>	nincs apoptotikus hatás (nekrozis)	

A táblázatban feltüntetett adatok kizárólag a FITC-annexin-V pozitív sejtek százalékos arányát mutatják.

#### 4.10 GnRH-III származékok *in vitro* antiproliferatív hatása

##### 4.10.1 Szimmetrikus GnRH-III dimerek

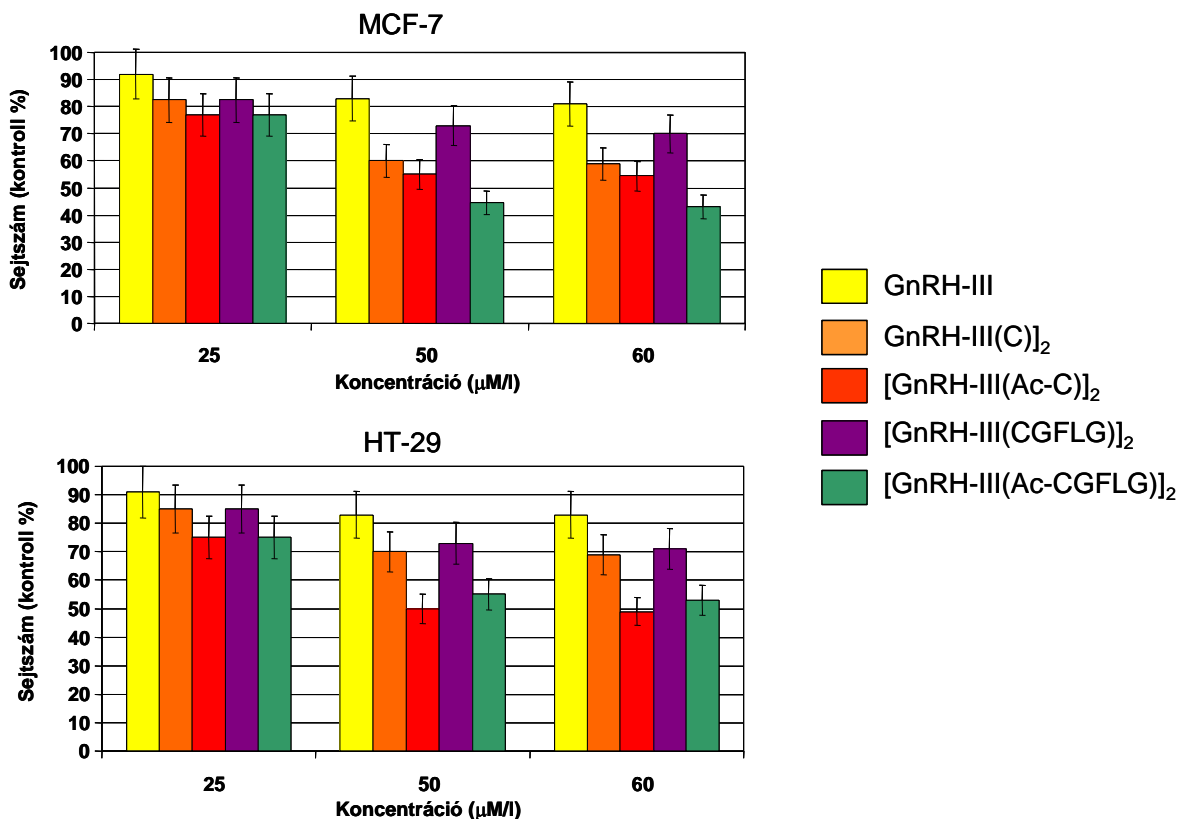
Előzetes méréseink kimutatták, hogy a GnRH-III és dimer származékai ([GnRH-III(C)]<sub>2</sub> és [GnRH-III(Ac-C)]<sub>2</sub>) képesek MCF-7 és HT-29 sejtek osztódását gátolni. Az egyik feltételezés szerint a dimerek a receptorok összekapcsolásával azok mikroaggregációját okozhatják, és ezáltal növekedhet a vegyület biológiai aktivitása. Mivel a receptorok sikeres összekapcsolásának térbeli feltételei lehetnek, ezért vizsgálni kívántuk hogy a dimer molekula peptidláncának távolsága befolyásolja-e a vegyületek hatékonyságát. Ezért a GnRH-III oldalláncába egy GFLG tetrapeptid oldalláncot építettem be és a távolságtartó szekvencia N-terminálisára kapcsoltam a ciszteint, melynek aminocsoportját ebben az esetben is acetileztem vagy szabadon hagytam. Az új dimer származékok hatását összehasonlítottuk a korábbi dimerek antiproliferatív képességével. A sejtproliferációs tesztet az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán végezték. A kísérlet során a sejteket öt napon keresztül 37°C-on tartották, ez idő alatt kétszer kezelték (első és harmadik napon) azokat a megfelelő dimer származékokkal, majd az ötödik napon sejtszámlálással meghatározták a GnRH-III analógok antiproliferatív hatását<sup>214</sup> (kísérleti rész 5.11 fejezet). A natív hormon nem

rendelkezett szignifikáns antiproliferatív hatással 50  $\mu$ M koncentrációban (15–20%,  $p > 0,05$ ). A GnRH-III pentapeptid szekvenciát nem tartalmazó dimer származékainak jelentős sejtosztódás gátló hatása volt. MCF-7 sejtek esetében a [GnRH-III(H-C)]<sub>2</sub> 40% ( $p < 0,05$ ) és [GnRH-III(Ac-C)]<sub>2</sub> 45% ( $p < 0,001$ ), míg HT-29 sejteken a [GnRH-III(H-C)]<sub>2</sub> 30% ( $p > 0,05$ ) és [GnRH-III(Ac-C)]<sub>2</sub> dimer valamivel magasabb, mint 50% ( $p < 0,001$ ) sejtosztódást gátló hatást okozott<sup>194</sup>.

Ezen előzetes eredmények alapján megvizsgáltuk az új elágazó láncú, enzimlabilis szekvenciát tartalmazó szimmetrikus dimerek antiproliferatív hatását. Hasonlóan az előzetes mérésekhez, MCF-7 és HT-29 sejteket alkalmaztunk. Az acetilcsoportot tartalmazó szimmetrikus dimer jobban gátolta a tumorsejtek növekedését MCF-7 sejteken, mint HT-29-en ([GnRH-III(Ac-CGFLG)]<sub>2</sub> MCF-7 sejteken (55% ( $p < 0,001$ ) és HT-29 sejtvonalon (44% ( $p < 0,001$ ) 50  $\mu$ M koncentrációt alkalmazva). A [GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub> dimer esetében MCF-7 (20 % ( $p > 0,05$ )) sejteken kisebb, míg HT-29 sejteken (27% ( $p > 0,05$ )) közel azonos antiproliferatív hatást tapasztaltunk a távtartó szekvenciát és acetilcsoportot nem tartalmazó dimerhez képest (43. ábra). A peptidkoncentráció emelésével nem tapasztaltunk további jelentős tumorsejtnövekedés gátlást.

A mérési eredmények alapján elmondható, hogy a [GnRH-III(Ac-CGFLG)]<sub>2</sub> bizonyult a leghatásosabbnak MCF-7 sejteken, míg HT-29 sejteken a [GnRH-III(Ac-C)]<sub>2</sub> és az [GnRH-III(Ac-CGFLG)]<sub>2</sub> közel azonos hatást mutatott.

Vagyis a távtartó szekvencia megléte nem befolyásolta az antiproliferatív hatást HT-29 sejteken. MCF-7 sejtek esetében az acetilsoporttal rendelkező spacer szekvencia szignifikánsan hatásosabb volt a távtartót nem tartalmazó dimernél, míg az acetilsoporttal nem rendelkező hatástalanabbnak bizonyult<sup>204</sup>.



43. ábra: A szimmetrikus GnRH-III dimerek antiproliferatív hatásának meghatározása sejtproliferációs teszttel MCF-7 és HT-29 sejteken

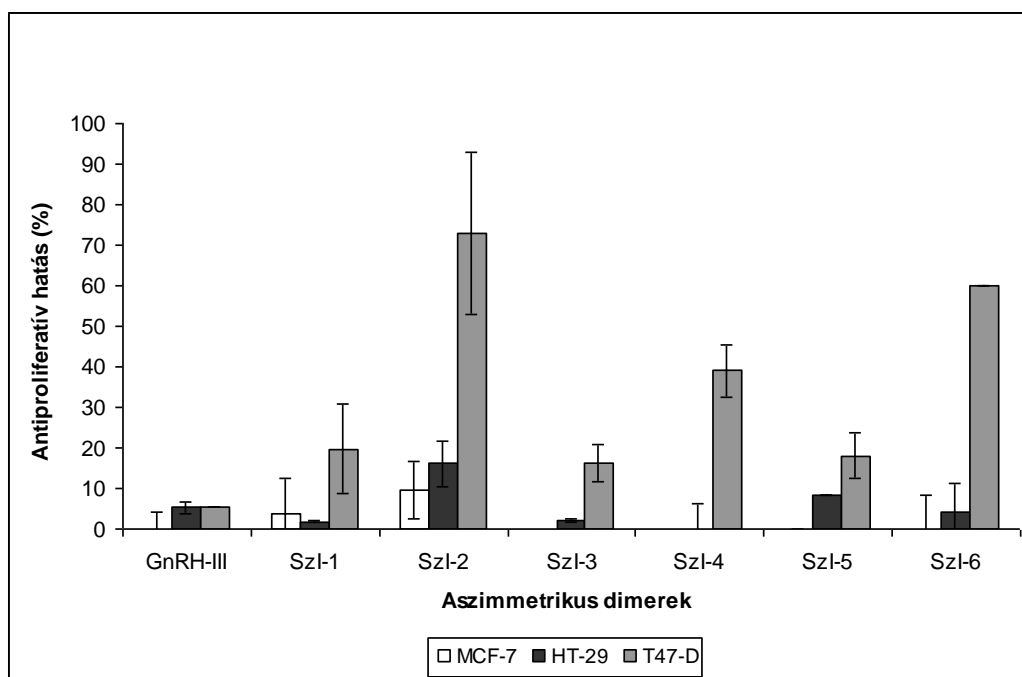
#### 4.10.2 Aszimmetrikus GnRH-III dimerek

A szimmetrikus dimerek antiproliferatív hatásának tanulmányozásakor az 50 µM-os koncentráció esetén kaptuk a legnagyobb antiproliferatív hatást, ami már a koncentráció emelésével nem változott jelentősen. Ezért az aszimmetrikus dimerekből is 50 µM-os koncentrációjú oldatot készítettünk, és vizsgáltuk a szimmetrikus dimerekhez hasonlóan a sejtproliferációra kifejtett hatásukat MCF-7, HT-29 és T-47D sejteken.

A mérési eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az aszimmetrikus dimerek közül a az SzI-2 (GnRH-III(-CH<sub>2</sub>CO)-[D-Cys<sup>6</sup>]GnRH-I) bizonyult a leghatásosabbnak mindhárom sejtvonalon. A többi dimer közül a SzI-4 (GnRH-III(-CH<sub>2</sub>CO-GFLG)-[D-Cys<sup>6</sup>]GnRH-I) és a SzI-6 (GnRH-III(Ac-C)-[D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I(-CH<sub>2</sub>CO-GFLG)) mutatott T-47D sejtvonalon szignifikáns antiproliferatív hatást. A három sejtvonal közül csak a T-47D sejtvonalon voltak



ezek a dimerek hatásosak, a másik két sejtvonalon nem érték el a szimmetrikus dimerek hatását, sőt némelyik még a natív GnRH-III hatását sem (44. ábra).



44. ábra: Az aszimmetrikus dimerek antiproliferatív hatásának összehasonlítása MCF-7, HT-29 és T47-D sejteken a sejtproliferációs teszttel végzett kísérletek során kapott eredmények alapján

A sejtproliferációs vizsgálatok során kapott adatok arra engednek következtetni, hogy a különböző sejteken eltérő mértékű gátló hatással rendelkeznek a szimmetrikus és az aszimmetrikus GnRH-III dimerek. A GnRH-III szimmetrikus dimerek MCF-7 és HT-29 sejteken bizonyultak hatásosnak, míg ezeken a tumorsejtvonalakon az aszimmetrikus dimerek egyike sem mutatott sejtproliferációt gátló hatást (44. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a sejtbejutási vizsgálatokban a szimmetrikus dimer származék (CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub>) MCF-7 és HT-29 sejtekbe történő bejutásának mértéke kb. ötöde volt a monomerének (ld. 70. oldal, 4.5.1 fejezet, 33. ábra). Az antiproliferációs vizsgálatokban viszont a monomernek volt alacsonyabb hatása a dimerekhez képest. Ez arra enged következtetni, hogy a dimernek nem kell feltétlenül bejutnia ahhoz, hogy a hatását kifejtse. Tehát elég ha kötődik a receptorhoz és jelátviteli folyamatokon keresztül gátolja a sejtosztódást.

Az aszimmetrikus dimerek többségére a T-47D emlő tumorsejtvonal érzékenynek bizonyult. Érdekes megjegyezni, hogy a három, T-47D sejteken hatásos aszimmetrikus dimer közül kettő (SzI-4 és SzI-6) távtartó szekvencián keresztül, míg a leghatásosabb SzI-2 dimer közvetlenül kapcsolódik egymáshoz. Ez alapján nem tudjuk egyértelműen megállapítani, hogy a távtartó, ciszteinnel meghosszabbított tetrapeptid rész befolyásolja-e a molekula

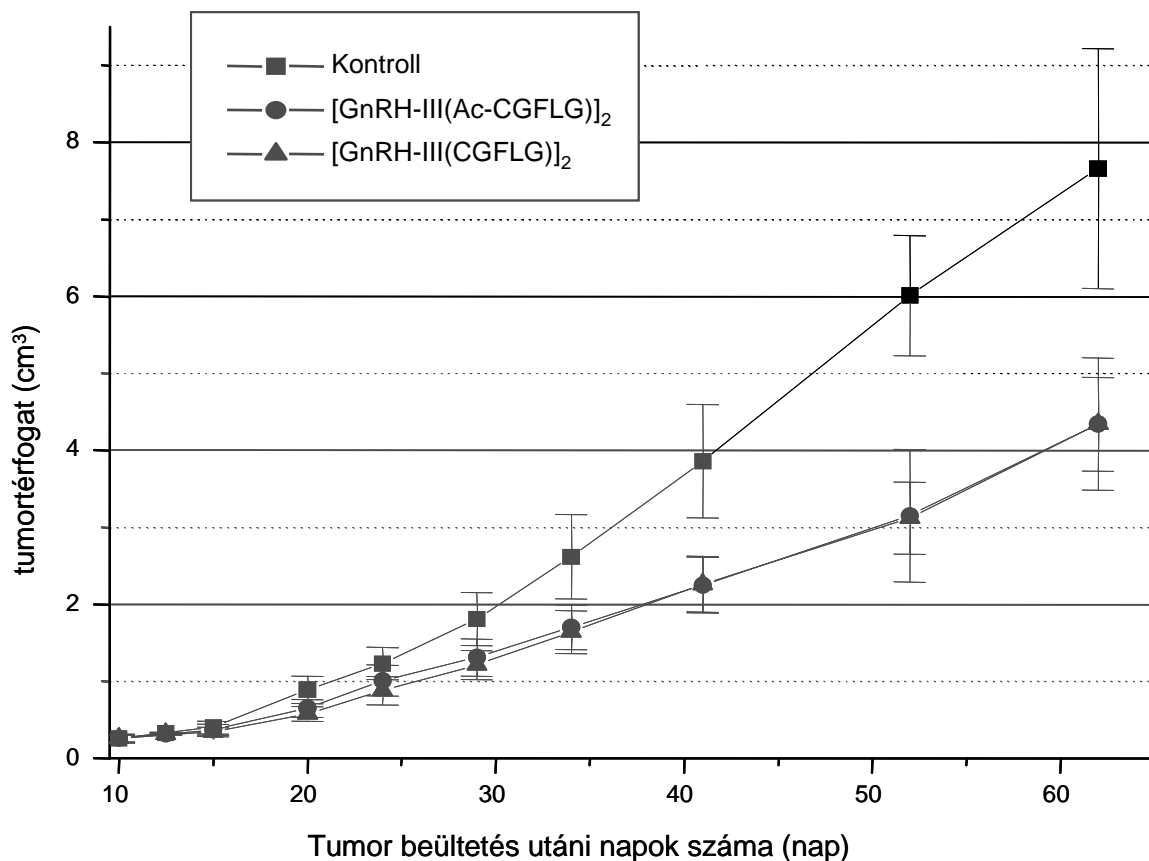
sejtosztódást gátló hatását. Előkísérleteink azt mutatták, hogy T47-D sejteken a szimmetrikus dimerek közül a  $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$  18%, míg a  $[\text{GnRH-III}(\text{CGFLG})]_2$  58%-os gátló hatást mutatott.

Bár sem az MCF-7, sem pedig a HT-29 sejtek osztódását gyakorlatilag nem gátolták az aszimmetrikus dimerek, mégis a különböző dimerek apoptotikus hatásának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a T-47D sejteken magas sejtproliferációt gátló hatással bíró három aszimmetrikus dimer jelentős apoptotikus hatással rendelkezett MCF-7 sejteken. Ezért feltétlenül meg kell vizsgálni a T-47D sejteken, hogy az aszimmetrikus dimerek képesek-e korai apoptózis kiváltására, vagy más mechanizmussal fejtik ki antiproliferatív hatásukat.

#### **4.11 GnRH-III szimmetrikus dimerek *in vivo* tumorelles hatása**

A szimmetrikus dimerek *in vivo* tumorelles hatásának meghatározása előtt *in vivo* toxicitásukat vizsgálták. Egyik dimer sem bizonyult toxikusnak a 21 napig tartó kísérlet alatt a 40-400 mg/ testsúly kg koncentráció tartományban. Az *in vitro* sejtproliferációs esszé során kapott eredmények alapján MCF-7 és HT-29 sejtek közül kellett kiválasztani az *in vivo* kísérletben tesztelni kívánt sejtvonalat. Bár a szimmetrikus dimerek hatásosabbak voltak MCF-7, mint HT-29 sejteken, mégis az utóbbit választottuk. A választásunk oka az volt, hogy az MCF-7 sejtek sejtciklusa igen lassú, nehezen erednek meg xenograftként az állatokban. A szimmetrikus dimerek *in vivo* antitumor hatásának vizsgálatához HT-29 xenograftot tartalmazó Balb/c egereket használtunk. Az első kezelés mindkét szimmetrikus dimer esetén a tumorbeültetést követő 10. napon történt. A GnRH-III dimereket ( $[\text{GnRH-III}(\text{H-CGFLG})]_2$  és  $[\text{GnRH-III}(\text{Ac-CGFLG})]_2$ ) hat héten keresztül minden nap intraperitoneálisan (i.p.) adagoltuk. A dimerek 40 mg/weightsúly kg adagolása a tumortérfogat csökkenését eredményezte. A kezeléseket a tumorbeültetést követő 41. napon fejeztük be (kísérleti rész 5.12.1 fejezet). Ekkor valamivel nagyobb, mint 40%-os tumornövekedés gátlást regisztráltunk a kontrollhoz képest és ez a gátló hatás megmaradt a további 20 kezelés nélküli nap alatt is, amíg a kísérletet követtük. Az alkalmazott dózis a szokásosnál jóval magasabb volt, aminek a peptid keringésbeli rövid életideje az oka. Hiszen a GnRH-I hormon periódikusan szabadul fel a hipofízisből, mert a peptid proteolízis során néhány perc alatt lebomlik. Ezért az alkalmazott dózis kiszámításánál figyelembe vettük a proteolitikus folyamatot, és a hatásos dózis feletti mennyiséget alkalmaztunk (200 $\mu\text{M}$ ), hogy kompenzáljuk a lebomlást, illetve, hogy közel azonos koncentrációt tartsunk fenn a keringésben egész nap. A kísérlet egész ideje alatt egyetlen egér sem pusztult el. Bár az *in vitro* vizsgálatokban lényeges különbséget figyeltünk meg az acetilezett és nem acetilezett származékok antiproliferatív hatása között, az *in vivo*

vizsgálatokban szinte teljesen azonos tumorelles hatást mutattak (45. ábra). A későbbiekben össze fogjuk hasonlítani ezen dimerek *in vivo* tumorelles hatását a távtartó szekvenciát nem tartalmazó dimerek aktivitásával is.

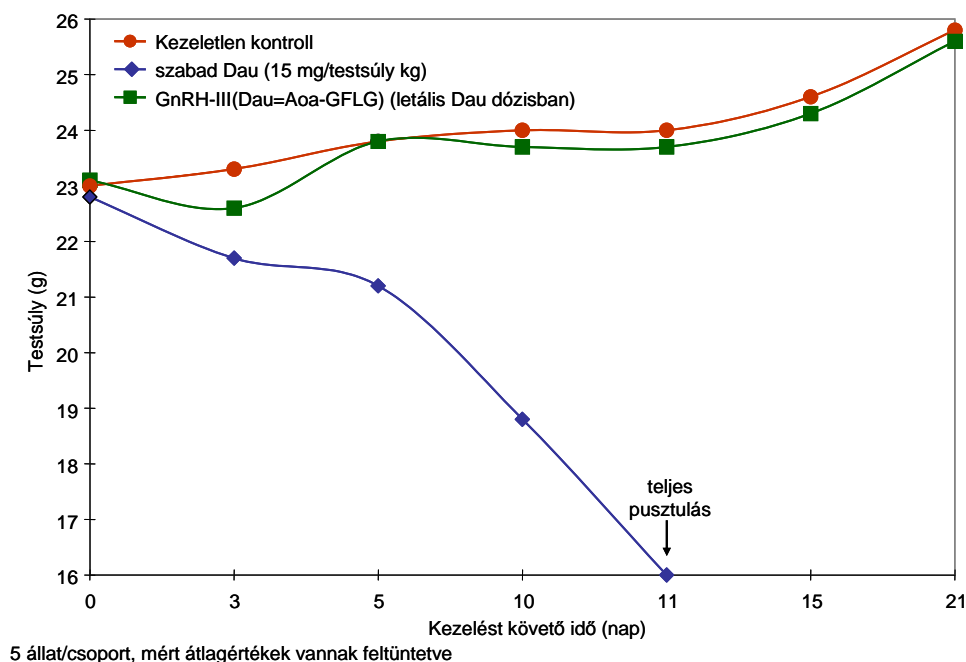


45. ábra: A szimmetrikus dimerek *in vivo* tumorelles hatása HT-29 xenograftot tartalmazó Balb/c egereken

#### 4.12 A Daunorubicin és a (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)) *in vivo* toxicitásának meghatározása

A szabad Dau és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) *in vivo* toxicitását egészséges BDF-1 nőstény egereken (5 egér minden csoportban) vizsgálták. Az egereket egyszer i.p. kezeltük 15 mg (26,6 µM)/testsúly kg szabad daunorubicinnel, vagy ekvivalens daunorubicin tartalmú konjugátummal (62,5 mg/testsúly kg, 24% Dau tartalom). A kísérletet 21 napig folytattuk (kísérleti rész 5.12.2 fejezet). A szabad hatóanyaggal kezelt egerek mindegyike elpusztult a kezelés utáni 10. és 12. nap között (11,3±0,76 nap). Ezzel szemben a konjugátummal kezelt állatok mindegyike életben maradt a vizsgálat végéig (21 nap).

A konjugátummal kezelt állatok testtömege csak kis mértékben csökkent a kezelést követő három napban, majd a növekedésük a kontrol állatokéhoz hasonló volt (46. ábra)<sup>203, 204</sup>.



46. ábra: A szabad Dau, illetve a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum hatása egészséges BDF-1 egerek testsúlyának változására és élettartamára

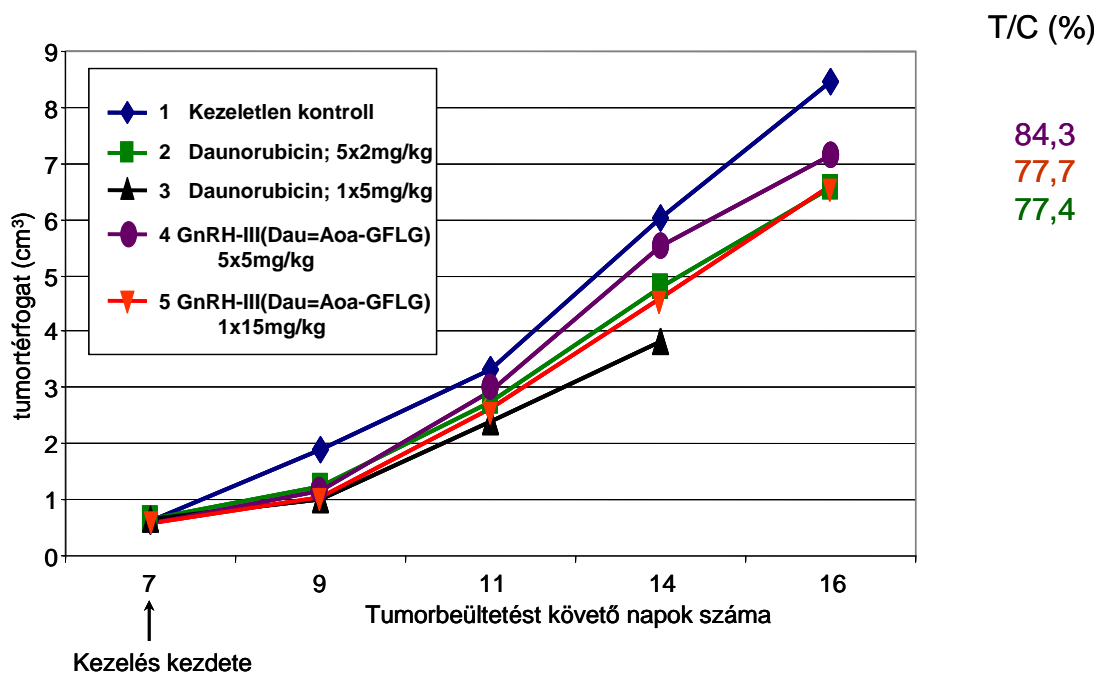
Egy újabb kísérletsorozatban azt is megállapították, hogy a konjugátum maximálisan tolerált dózisa (MTD) 30 mg Dau tartalom/ testsúly kg fölött van, mert ilyen dózis esetén sem tapasztaltak toxikus hatást.

#### 4.13 Daunorubicin és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) *in vivo* antitumor hatása C26 tumort hordozó egerekben

Az *in vitro* citosztatikus hatás vizsgálata során kapott eredmények alapján a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot választottuk ki az *in vivo* kísérletekhez. A konjugátum *in vivo* antitumor hatásának vizsgálatához Balb/c egerekbe beültetett C26 xenograftot használtunk (5 egér minden csoportban). Bár a kiválasztott konjugátum hatásosabb volt MCF-7, mint C26 sejteken *in vitro* vizsgálatokban, mégis ez utóbbit választottuk, mert a C26 egér eredetű vastagbél tumor viszonylag gyorsan képes megeredni egerekben, és egy agresszív tumorfajta lévén nagyon gyorsan növekedik, így az eredmények viszonylag gyorsan detektálhatók. *In vivo* Balb/c egereken végzett vastagbél daganat xenograftokra irodalmi adatot nem találtunk.

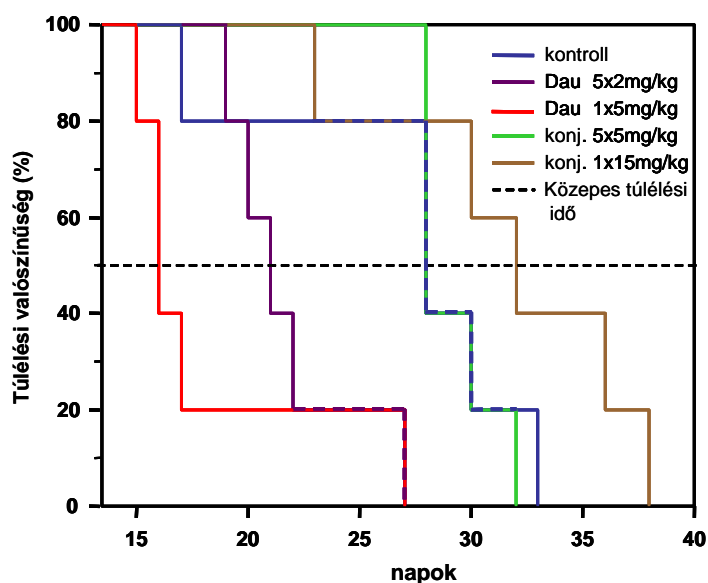
Az első kezelés mindkét vegyület (szabad Dau és a konjugátum) esetén a tumorbeültetést követő 7. napon történt. A vegyületeket egyszer, vagy kétnaponta öt

alkalommal i.p. injektáltuk az állatokba (kísérleti rész 5.12.3.1 fejezet). A tumortérfogat mérését a tumorbeültetést követő 16. napig végeztük, mert az egyik egér a kontrol csoportból a 17. napon elpusztult. A szabad hatóanyag 5 mg/testsúly kg (egyetlen adagolás) a tumortérfogat szignifikáns csökkenését idézte elő (36,4%) a kezelést követő egy héten belül (47. ábra).



47. ábra: A daunorubicin és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) in vivo tumorelles hatása C26 vastagbél daganatot tartalmazó egerekben (1. kísérlet)

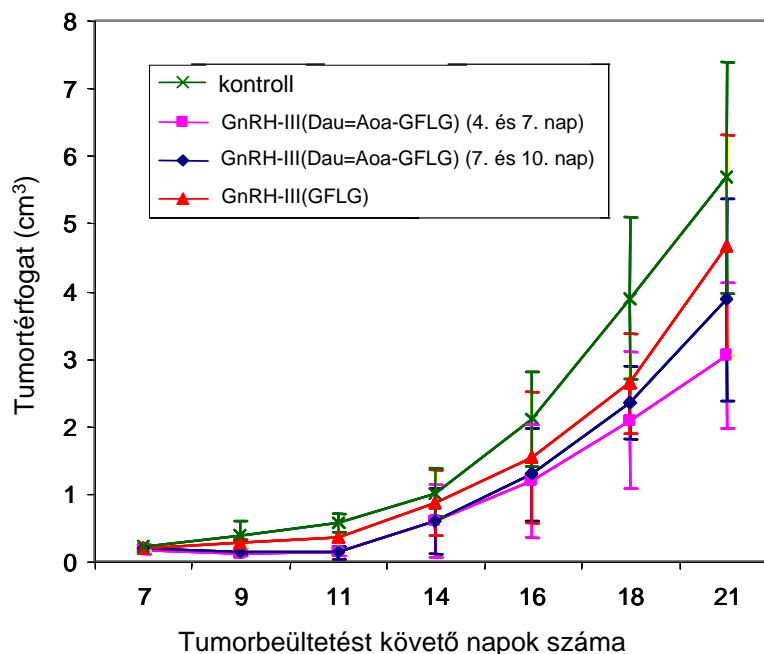
Ennek ellenére a daunorubicin okozta toxikus hatás miatt 4 egér elpusztult a kezelés 15-17 napján (48. ábra).



48. ábra: Túlélés a Kaplan-Meier túlélési görbe alapján

A daunorubicin alacsonyabb dózisú alkalmazása, 5-ször 2 mg/testsúly kg, átlagban 22,6% tumornövekedésgátlást eredményezett a kontrol csoporthoz képest a kísérlet befejezésekor (47. ábra). A daunorubicin toxikus mellékhatása ebben az esetben is megfigyelhető volt, ugyanis a közepes túlélési idő a Kaplan-Meier túlélési görbe<sup>215</sup> alapján 21 nap volt ebben a csoportban, míg a kezeletlen tumoros kontrol csoport esetében 27 nap (48. ábra). Hasonló gátló hatást tapasztaltunk (22,3%) a konjugátum esetén, amikor azt 15 mg Dau tartalom/testsúly kg dózisban alkalmaztuk. A konjugátumot alacsonyabb dózisban (5 mg Dau tartalom/testsúly kg) adagolva kevésbé bizonyult hatásosnak még abban az esetben is, amikor ötször ismételtük meg a kezelést (átlag 15,7%). Ez utóbbi esetben nem tapasztaltunk túlélés növekedést, míg a konjugátum nagyobb dózisát egyszer alkalmazva nem szignifikáns, de mérhető (14,3%) túlélés növekedést értünk el. A túlélés növekedés azonban szignifikáns, ha a konjugátum és a szabad hatóanyaggal végzett kezelést hasonlítjuk össze (>52%)<sup>203, 204</sup> (48. ábra).

A második kísérletben az egereket a tumor beültetést követő 4. és 7., vagy pedig a beültetést követő 7. és 10. napon kezeltük a daunorubicin tartalmú konjugátummal (15 mg Dau tartalom /testsúly kg) (kísérleti rész 5.12.3.2 fejezet). Mindkét esetben szignifikánsan magasabb tumornövekedés gátlást figyeltünk meg (46%, illetve 32% gátlás a 21. napon meghatározva) (49. ábra).



49. ábra: A daunorubicin és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) in vivo tumorelles hatása C26 vastagbél daganatot tartalmazó egerekben (2. kísérlet)

Ebben a kísérletben a tumornövekedés lassabb volt a kontrol állatokban, mint az előző vizsgálat során, mégis jelentősnek mondható az a tény, hogy a konjugátummal kezelt állatokban a 11. napig csökkent a tumortérfogat. Ezek alapján a tumornövekedés gátlása 70-80%-os volt 11 nap után, de a kísérlet befejezésekor (21. nap) kb. 45%, illetve 32% inhibíciót regisztráltak. Vizsgáltuk továbbá a szabad, hatóanyagot nem tartalmazó GnRH-III(H-GFLG) hormon származék antitumor hatását is. A kísérlet végén kismértékű, de nem szignifikáns tumornövekedést gátló hatást tapasztaltunk a kontrol csoporthoz képest (18%). Azonban a kezelés ideje alatt maga a hatóanyagot nem tartalmazó GnRH-III származék 30-40%-os tumornövekedést gátló hatást mutatott. Ebben a kísérletben a kontrol csoport és a konjugátummal kezelt csoportok (7. és 10. napon, illetve a 4. és 7. napon) átlagos túlélési ideje 29, 35 és 40 nap volt. A kezelt állatok túlélési ideje a kontrolhoz képest 21%, illetve 38%-kal növekedett meg.

Azok az állatok, amelyeket a hatóanyagot nem tartalmazó GnRH-III származékkal kezeltünk, ugyancsak tovább éltek, de ebben a csoportban a hét egérből négy elpusztult a tumorbeültetést követő 37. napon. Ezért az 50%-os túlélési időt nem tekinthetjük mérvadónak az összehasonlításhoz. A kontrol csoport (29 nap) és a GnRH-III származékkal kezelt csoport (33 nap) átlagos túlélési ideje 14%-kal nőtt meg. A Kaplan-Meier görbe alapján a legkedvezőbb eredményt a túlélés szempontjából akkor kaptuk, amikor az állatokat daunorubicint tartalmazó GnRH-III származékkal kezeltük, a 4. és 7. napon (kontrol csoporthoz viszonyítva,  $p = 0,0009$ , log-rank teszt). Az egereket vizsgáltuk a testsúlyuk alapján is. Azok az egerek, amelyeket a konjugátummal kezeltünk 15%-kal nagyobb testsúlyúak voltak, mint a szabad hatóanyaggal kezelt egyedek.

Az eredmények azt mutatják, hogy az állatok túlélnek a daunorubicin halálos dózisát is, amennyiben GnRH-III származékhoz mint célbavívó egységhez oximkötéssel konjugáva, akár ismételt kezeléseket alkalmazva adagoljuk. A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum egyszeri 15 mg Dau tartalom/testsúly kg adagolást alkalmazva azonos tumornövekedés gátló hatást értünk el, mint amikor a szabad hatóanyagot adagoltuk 2 mg/testsúly kg dózisban ötszöri ismételt kezelésben. Ugyanakkor a konjugátum alkalmazásával megnövekedett az egerek élettartama, a szabad hatóanyaggal kezelt állatokhoz képest. Jelentős tumornövekedés gátló hatást és túlélést tapasztaltunk, amikor a konjugátumot a 4. és 7. napon adtuk az állatoknak 15 mg Dau tartalom/testsúly kg dózisban.

Ez az első olyan vegyület az irodalomban, amely oximkötést tartalmazó daunorubicin származékot tartalmaz és jelentős tumornövekedést gátló hatást mutat.

## 5 Kísérleti rész

### 5.1 Általános protokollok

#### 5.1.1 Szintézis

A doktori munkám során előállított peptidek szintézisét vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával valósítottam meg, amelyek protokollját az alábbi táblázatok foglalják össze.

17. táblázat: A Boc/Bzl stratégia protokollja

	idő, perc	ismétlések száma
Mosás (DCM)	0,5	3
Boc védőcsoport hasítása (33% TFA/DCM)	2	1
	20	1
Mosás (DCM)	0,5	5
Semlegesítés (10% DIEA/DCM)	1	4
Mosás (DCM)	0,5	4
Kapcsolás (3 ekv. Boc-Aaa-OH / 3 ekv. HOBt / 3 ekv. DCC)	60	1
Mosás (DMF)	1	2
Mosás (DCM)	0,5	2
Ninhidrin teszt	3-5	

Amennyiben a kapcsolás sikertelen volt, vagyis a ninhidrin teszt pozitív színreakciót mutatott, a lépéseket a semlegesítéstől kezdve megismételtem.

18. táblázat: Az Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia protokollja

	idő, perc	ismétlések száma
<b>Mosás (DMF)</b>	1	3
<b>Fmoc védőcsoport hasítása (2% DBU/ 2% piperidin/ DMF)</b>	2	1
	2	1
	5	1
	10	1
<b>Mosás (DMF)</b>	1	8
<b>Kapcsolás (3 ekv. Fmoc-Aaa-OH / 3 ekv. HOBt / 3 ekv. DIC)</b>	60	1
<b>Mosás (DMF)</b>	1	3
<b>Mosás (DCM)</b>	0,5	2
<b>Ninhidrin teszt</b>	3-5	

Újrakapcsolás esetén a hasítást követő dimetilformamiddal történő mosási lépéstől ismételtem meg a protokolt.



### 5.1.2 A peptidek hasítása

A szintéziseket követően minden peptid esetében kétlépéses hasítást hajtottam végre, melyre azért volt szükség, mert a GnRH származékokat vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával állítottam elő.

Első lépésben az Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával felépített peptidrész aminosavainak oldallánc védőcsoportjait (Boc, Trt és <sup>t</sup>Bu) távolítottam el trifluorecetsavas közegben víz és EDT jelenlétében (hasonlóan a Boc védőcsoport hasításához) két lépésben, 2 + 20 perces hasítási idő alkalmazásával. A hasítást követően a Boc/Bzl stratégia lépéseit végeztem el a kapcsolási lépés kihagyásával.

19. táblázat: A kétlépéses hasítási protokoll trifluorecetsavas hasításához szükséges anyagok összefoglaló táblázata

Szükséges anyag	Szükséges mennyiség
EDT	0,25 ml
víz	0,25 ml
TFA	9,5 ml

Az első hasítási lépést követően minden peptid esetében a peptid-gyantát mostam diklórmetánnal, semlegesítettem 10% DIEA/DCM elegyével, majd újabb diklórmetános mosást követően abs. etanollal mostam, és egy éjszakán át ekszikátorban szárítottam.

Végül hidrogénfluoriddal a megfelelő gyökfogók jelenlétében (19. táblázat) hasítottam le a peptideket a gyantákról 0 °C-on 1,5-2 óra reakcióidő alatt.

20. táblázat: A hidrogénfluoridos hasításhoz szükséges anyagok összefoglaló táblázata

Szükséges anyag	Szükséges mennyiség
p-krezol	1,0 g
DTT	0,1 g
HF	10 ml

A lehasított nyers peptideket kb. 50 ml hideg éterben kicsaptam, a kapott csapadékokat szűrtem, mostam kétszer további 10 ml hideg éterrel. Ezt követően a peptideket kioldottam a gyanta mellől - a peptid mennyiségétől függően - 50-200 ml 10%-os ecetsavval. A vizes oldatokat lefagyasztottam és liofilizáltam.

### 5.1.3 Tisztítás és analitikai paraméterek meghatározása (RP-HPLC és ESI-MS)

A nyers peptideket és konjugátumokat Phenomenex Jupiter C18 oszlopon (10 µm, 300Å, 250 x 10 mm I.D.) (Torrance, CA) tisztítottam. Az alkalmazott folyási sebesség

4 ml/perc volt és a csúcsokat  $\lambda=220$  nm-en detektáltam. A tisztítás során A-eluensként 0,1% TFA/víz, B-eluensként pedig 0,1% TFA/acetonitril/víz 80:20 v/v elegyét használtam lineáris gradienselúció létrehozásának érdekében: 10–60% B 50 perc alatt.

A tisztított GnRH származékok retenciós idejét RP-HPLC kromatogram felvételével kaptam meg. A dimerizációs és konjugációs reakciók követéséhez is analitikai RP-HPLC rendszert használtam. Az analitikai RP-HPLC esetén, hasonlóan a tisztításhoz Knauer (H. Knauer, Bad Homburg, Germany) HPLC rendszert használtam. Állófázisként Phenomenex Synergy C12 oszlop (4  $\mu$ m, 80Å, 250 x 4,6 mm I.D.) (Torrance, CA) szolgált. A tisztítás során használt eluenseket alkalmaztam az analitikai kromatogrammok felvételéhez lineáris gradienselúcióval (0 perc: 1% B, 5 perc 1% B, 50 perc 99% B). Az alkalmazott áramlási sebesség 1 ml/perc volt,  $\lambda=220$  nm-en detektáltam a csúcsokat.

A peptidek azonosítását tömegspektrometriával végeztem. ESI-MS, Bruker Esquire 3000 Plus Ioncsapdás Tömegspektrométert alkalmaztam (Bremen, Germany), folyamatos mintaadagolással, 4  $\mu$ l/perc folyási sebesség mellett vettem fel a tömegspektrumokat. A mintákat 0,01% ecetsavat tartalmazó 50% acetonitril - 50% víz elegyében oldottam fel. A tömegspektrumokat pozitív ion módban  $m/z$  50-2500 tartományban vettem fel. A peptidek és konjugátumaik monoizotópos molekulatömegét az alábbi program segítségével számítottam ki: <http://biochemistry.wur.nl/Biochem/facility/pepcalc.htm>.

#### 5.1.4 *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok

A szintetikusan előállított, analitikailag jellemzett GnRH-III származékokkal és konjugátumokkal különböző *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat végeztünk.

Az *in vitro* vizsgálatokban MCF-7, T-47D, C26 és HT-29 sejtvonalakat használtunk. Az MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteket 10% hő-inaktivált magzati borjúsérumot (fetal calf serum, FCS; Sigma), nemesszenciális aminosavakat (NEAA), L-glutamint (2 mM/ml) és gentamicint (160  $\mu$ g/ml) tartalmazó DMEM (Sigma Ltd. St. Louis, MO) médiumban tenyésztettük. T-47D human emlő-, C26 egér vastagbél- és a HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteket 10% FCS-t, L-glutamint (2 mM/ml) és gentamicint (160  $\mu$ g/ml) tartalmazó RPMI-1640 (Sigma Ltd. St. Louis, MO) médiumban növesztettük. A sejteket műanyag sejtenyésztő flaskában tartottuk fenn 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> / 95% levegőn.

Az *in vivo* vizsgálatok során használt 22-24 g testtömegű ivarérett nőstény egereket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának SPF (specified pathogen free) állatházában tenyésztették és a későbbiek során leírt *in vivo* vizsgálatokat is itt végezték. Az állatokat 22-24°C-on 40-50% páratartalom és 12/12 órás fény/sötét periódus mellett tartották. Az állatokat Charles River VRF1 táppal etették és csapvízzel itatták.

## 5.2 Szintetikus munka

### 5.2.1 Lineáris GnRH származékok szintézise

A lineáris GnRH származékok szintézisét manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével valósítottam meg. A peptideket 500-500 mg MBHA (1,2 mmol/g gyantakapacitású) gyantán építettem fel vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával.

#### 5.2.1.1 Natív GnRH molekulák szintézise

A GnRH-I (<EHWSYGLRPG-NH<sub>2</sub>) esetében a hét C-terminális aminosavat (Gly, Pro, Arg, Leu, Gly, Tyr, Ser). A GnRH-II (<EHWSHGWYPG-NH<sub>2</sub>) esetében a triptofánig, GnRH-III szintézisekor az Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazék beépítéséig alkalmaztam Boc/Bzl stratégiát. A Boc/Bzl stratégia protokollját a 16. táblázat mutatja be.

A molekulák további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával építettem fel. A GnRH-I és a GnRH-II esetében a triptofán míg a GnRH-III szintézisének folytatásakor a lizin Fmoc védőcsoportját eltávolítottam 2% piperidin/ 2% DBU dimetilformamid oldatával, majd a 18. táblázatban leírt protokoll szerint folytattam a szintézist. A GnRH peptidek N-terminális aminosava piroglutaminsav, melyet nem védett formában kapcsoltam a peptid-gyantához. A kapcsolások sikerességét ninhidrin teszttel ellenőriztem minden ciklus végén. Minthogy a GnRH molekulák kilencedik aminosava prolin, az ezt követő aminosav felkapcsolódását viszont a ninhidrin teszt nem mutatja ki, sikertelen kapcsolás esetén is sárga színt kapunk. Ezért a prolinhoz történő kapcsolás ellenőrzéséhez izatin tesztet használtam.

A szintézis végén kétlépéses hasítási protokollt hajtottam végre. Az első lépésben a gyantákon lévő peptidek Trt, <sup>t</sup>Bu és Boc védőcsoportjainak eltávolítását valósítottam meg a 19. táblázatban foglaltak felhasználásával. A második lépésben lehasítottam a peptideket a gyantákról a 19. táblázatban szereplő vegyszerek alkalmazásával 0°C-on. A hasítási idő másfél óra volt. A hasítást követően az 5.1.2. fejezetben leírtak szerint jártam el. A kapott kb. 500 mg nyers peptideket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, és analitikailag jellemeztem (17. ábra és 2. táblázat).

A natív GnRH peptideket az alábbi kitermeléssel tudtam előállítani: GnRH-I: 79%; GnRH-II: 71%; GnRH-III: 75%.

#### 5.2.1.2 Rövidített GnRH-III fragmens peptidek szintézise

Az *N*-terminális felől rövidített GnRH-III származékok szintézisekor három fragmens peptidet állítottam elő (GnRH-III(2-10) (Ac-HWSHDWKPG-NH<sub>2</sub>), GnRH-III(3-10) (Ac-WSHDWKPG-NH<sub>2</sub>), GnRH-III(4-10) (Ac-SHDWKPG-NH<sub>2</sub>)). A három fragmens szintézisét 500 mg MBHA gyantán (1,2 mmol/g), vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával végeztem. Az első három *C*-terminális aminosavat Boc/Bzl stratégiával, míg a molekulák további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával szintetizáltam. A *C*-terminális felőli hetedik aminosav elérésekor lehasítottam az Fmoc védőcsoportot, majd a peptid-gyanta egyharmadát kivettem, és az *N*-terminálisát ecetsav-anhidrin, DIEA dimetilformamidos elegyével (1:1:3 v/v) acetileztem egy órás reakcióidő alkalmazása mellett. Így megkaptam az első GnRH-III fragmens származékot (GnRH-III(4-10)). A peptid-gyanta kétharmadával tovább folytattam a szintézist a következő aminosav felkapcsolásáig (Fmoc-Trp-OH). Ekkor az Fmoc-csoport hasítását követően megfeleztam a maradék peptid-gyantát. Az egyik felével folytattam a szintézist (Fmoc-His(Trt)-OH), míg a másik felét acetileztem Ac<sub>2</sub>O: DIEA: DMF = 1:1:3 térfogatarányú elegyével egy órán át. Így egy újabb fragmenst állítottam elő (GnRH-III(3-10)). A maradék egyharmad peptid-gyantáról lehasítottam az Fmoc védőcsoportot és ennek *N*-terminálisát is acetileztem a másik két fragmenshez hasonlóan és megkaptam az utolsó *N*-terminális felől rövidített GnRH-III fragmenst is (GnRH-III(2-10)). A kapcsolás sikerességét ezekben az esetekben is ninhidrin/izatin teszttel ellenőriztem.

Ezt követően a fragmensek esetében is kétlépéses hasítási protokolt hajtottam végre. Az első lépésben a gyantákon lévő peptidek Trt, <sup>t</sup>Bu és Boc védőcsoportjainak eltávolítását valósítottam meg a 19. táblázatban foglalt reagensek felhasználásával. A hasítás második lépésében lehasítottam a peptideket a gyantákról HF segítségével a 20. táblázatban szereplő gyökfogók alkalmazásával 0°C-on másfél óra alatt. A lehasított nyers peptidek esetén az 5.1.2. fejezetben leírt lépéseket alkalmaztam azzal a különbséggel, hogy a kicsapást kb. 25-25 ml hideg éterben végeztem.

Minden esetben kb. 150-200 mg nyers peptidet kaptam, amit szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam és analitikailag jellemeztem (17. ábra és 2. táblázat). A szintézis során 75-80 %-os kitermeléssel állítottam elő a GnRH-III fragmens peptideket.

### 5.2.1.3 *D*-aminosavat tartalmazó GnRH származékok szintézise

A *D*-aminosavat tartalmazó GnRH származékokat is szilárdfázisú peptidszintézis módszerével 1,2 mmol/g gyantakapacitású MBHA gyantán, vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával építettem fel. A GnRH-I származékok (<EHWSYcLRPG-NH<sub>2</sub>, <EHWSYkLRPG-NH<sub>2</sub> és <EHWSYwLRPG-NH<sub>2</sub>) esetében öt *C*-terminális aminosavat (1 g gyantán), míg a GnRH-II származék (<EHWSHcWYPG-NH<sub>2</sub>) esetében csak az első három *C*-terminális aminosavat kapcsoltam a gyantához (0,5 g) Boc/Bzl stratégia alkalmazása mellett (17. ábra).

A molekulák további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával építettem fel. A *C*-terminális felőli ötödik aminosav elérésekor a GnRH-I származékok peptid-gyantáját három részre osztottam, egyik részéhez Fmoc-*D*-Cys(Trt)-OH, a másik részéhez Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OH, míg a harmadik részéhez Fmoc-*D*-Trp-OH aminosavszármazékot kapcsoltam. A GnRH-I származékok esetében a *D*-cisztein, a *D*-lizin, valamint a *D*-triptofán Fmoc-védett származékainak, míg a GnRH-II származék triptofán aminosavának Fmoc védőcsoportját eltávolítottam 2% piperidin/ 2% DBU dimetilformamidos oldatával, majd a 18. táblázatban leírt protokoll szerint folytattam a szintézist. Az *N*-terminális piroglutaminsavat nem védett formában kapcsoltam a peptid-gyantához.

A kapcsolások sikerességét ninhidrin/izatin teszttel ellenőriztem minden ciklus végén.

A szintézis végén a *D*-aminosavas származékok esetében is kétlépéses hasítási protokollt hajtottam végre. A GnRH származékok hasítását hidrogénfluoriddal másfél órán át végeztem 0°C-on. A hasítást követően ebben esetben is az 5.1.2. fejezetben leírtak szerint jártam el.

Nyers termékként a GnRH-I származékokból kb. 300-350 mg, míg a GnRH-II származékból 450 mg peptidet kaptam, amit szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam és analitikailag jellemeztem (2. táblázat). A szintézist [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I és [*D*-Trp<sup>6</sup>]GnRH-I esetében 80%-os, míg a [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-I esetében csupán 40%-os kitermeléssel tudtam megvalósítani. A [*D*-Cys<sup>6</sup>]GnRH-II esetében hasonlóan alacsony (35%) kitermelést kaptam, melynek az volt az oka, hogy már a tisztítás körülményei között is dimerizálódott a peptid, nemkivánt dimer mellékterméket képezve.

### 5.2.1.4 Klóracetilcsoportot tartalmazó GnRH-III szintézise

A klóracetilcsoportot tartalmazó GnRH-III (<EHWSHDWK(ClAc)PG-NH<sub>2</sub>) szintézisekor hasonlóan jártam el, mint a lineáris molekulák szintézisében leírt GnRH-III esetében. Ebben az esetben is 500 mg, 1,2 mmol/g gyantakapacitású MBHA gyantát

használtam vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazása mellett. A két stratégia protokollját az általános protokollok 5.1. fejezet 16. és 17. táblázata mutatja be.

Az *N*-terminális piroglutaminsavat ebben az esetben is védőcsoport nélkül kapcsoltam a peptid-gyantához. A kapcsolások sikerességét ninhidrin/izatin teszttel ellenőriztem.

A szintézis végén kétlépéses hasítási protokolt hajtottam végre. Az első trifluorecetsavas hasítási lépést követően mostam, semlegesítettem a gyantát a Boc/Bzl stratégia oldataival. Ezután felkapcsoltam a lizin szabaddá váló  $\epsilon$ -aminocsoportjára a klóracetilcsoportot gyantakapacitásra számolt 5 ekvivalensnyi ClAc-OPcp dimetilformamidos oldatával. A kapcsolási idő két óra volt szobahőmérsékleten. Végül a gyantán lévő peptidet ekszikátorban egy éjszakán keresztül szárítottam. A peptid gyantáról való lehasítását HF-dal *p*-krezol és *p*-tiokrezol<sup>201</sup> (10 ml: 0,5g: 0,5g) jelenlétében másfél órán át 0°C-on végeztem. Majd az 5.1.2. fejezet lépéseit követve a kapott vizes oldatot liofilizáltam.

Nyerstermékként 550 mg peptidet kaptam, amit szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A tisztítás előtt híg ammóniaoldatot adtam a peptidhez, hogy a hisztidinről a klóracetilcsoportot eltávolítsam. A tiszta peptidek analitikai jellemezését a (17. ábra és 2. táblázat) foglalja össze.

A szintézist 75 %-os kitermeléssel tudtam megvalósítani.

### 5.2.2 Elágazó láncú GnRH származékok szintézise

A lineáris GnRH származékok szintéziséhez hasonlóan manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével, vegyes Boc/Bzl és Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával állítottam elő az elágazó láncú GnRH peptideket.

#### 5.2.2.1 Elágazó láncú GnRH-III származékok szintézise

A különböző elágazó láncú GnRH-III származékokat MBHA gyantán (1,04 mmol/g gyantakapacitás) építettem fel. A szintézis során az első két *C*-terminális aminosavat (Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH) Boc/Bzl stratégia alkalmazásával kapcsoltam a gyantához, ezt követően Fmoc-Lys(Boc)-OH aminosavszármazékot kötöttem a peptid-gyantához. Majd a lizin oldalláncát védő Boc védőcsoportot eltávolítottam, és kiépítettem a megfelelő szekvenciájú oldalláncokat Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O, Boc-Phe-OH és Boc-Cys(Meb)-OH aminosavszármazékok felhasználásával. Ily módon az alábbi oldalláncok kiépítését valósítottam meg: NH<sub>2</sub>-C-, NH<sub>2</sub>-GFLG- és NH<sub>2</sub>-CGFLG-.

Ezt követően lehetőség nyílt az oldallánc *N*-terminálisának funkcionálisítására.

Acetilezett származékokat az oldalláncban ciszteint (H-C) és ciszteinnel meghosszabbított tetrapeptid távtartót (H-CGFLG) tartalmazó származékok esetében állítottam elő. Ekkor a cisztein felkapcsolását követően eltávolítottam a Boc/Bzl stratégia protokollja szerint a Boc aminovédőcsoportot 33% TFA/DCM elegyével, majd a kapcsolási lépésben  $\text{Ac}_2\text{O}:\text{DIEA}:\text{DMF} = 1:1:3$  v/v elegy felhasználásával acetileztem az oldallánc szabad *N*-terminálisát 1 órán át szobahőmérsékleten.

A tetrapeptid szekvenciát (H-GFLG) oldalláncban tartalmazó GnRH-III esetében a glicint követő kapcsolási lépésben Boc-aminooxiecetsav (Boc-Aoa-OH) felkapcsolásával oximkötés kialakítására alkalmas vegyület állítható elő. Ennek a származéknak a peptid-gyantához való kapcsolását az aminosavszármazékokhoz hasonlóan mind a kapcsolóreagensekből (HOBt és DIC), mind pedig a Boc-védett aminooxiecetsavból gyantakapacitásra számolt 2 ekvivalensnyi mennyiséggel végeztem. A kapcsolási időt viszont egy órától két órára növeltem.

A peptidek további részének szintézisét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával folytattam. Így a lizin Fmoc védőcsoportját eltávolítottam, majd Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH és Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH aminosavak felhasználásával felépítettem az elágazó láncú GnRH-III analógokat. Végül, a természetes peptidekhez hasonlóan, védőcsoportot nem tartalmazó piroglutaminsavat kapcsoltam a molekulák *N*-terminálisára.

A lineáris származékok esetében leírt kétlépéses hasítási protokoll alkalmazásával kaptam meg az elágazó láncú szabad peptideket.

Az acetilezett és aminooxicsoprotot tartalmazó oldallánccal rendelkező GnRH-III származékokon kívül előállítottam klóracetilcsoportot tartalmazó analógot is. Ez a funkcionális a Boc védőcsoport lehasítását követően valósítható meg a szintézis végén, de még a végső hasítási lépés előtt. Előzetes kísérleteinkben ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a klóracetilcsoport sérül az Fmoc védőcsoport hasításakor használt bázisos közegben. A funkciós csoport beviteléhez a semlegesítést követő mosás után gyantakapacitásra számolt 5 ekvivalens ClAc-OPcp-vel két órán át szobahőmérsékleten reagáltattam a peptid-gyantát.

Végül a gyantán lévő peptidet ekzikátorban egy éjszakán keresztül szárítottam.

A végső hasítási lépést hidrogénfluoriddal *p*-krezol és DTT jelenlétében (20. táblázat), míg a klóracetilezett származék esetében *p*-krezol és *p*-tiokrezol (HF-*p*-krezol- *p*-tiokrezol= 10 ml: 1 g: 1 g) mint gyökfogók jelenlétében távolítottam el a peptidet a gyantáról. A hasítást másfél óra alatt 0°C-on végeztem. A hasítást követő feldolgozás után kapott vizes oldatokat lefagyasztottam és liofilizáltam. Az aminooxicsoprotot tartalmazó GnRH-III származék esetében a fagyasztást nem a szokásos aceton-szárazjég hűtőkeverékkel végeztem, hanem

folyékony nitrogénnel. Erre azért volt szükség, mert az aminosavak rendkívül érzékeny, nyomnyi mennyiségű acetonnal jelenlétében már oximvegyületté alakul.

A nyers termékeket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, kivéve a GnRH-III(Aoa-GFLG) származékot, mert azt tisztítás nélkül használtam fel a hatóanyagokkal való konjugációhoz. A tiszta peptidek analitikai jellemzését a 18. ábra és 3. táblázat mutatja.

A klóracetilcsoportot tartalmazó elágazó láncú GnRH-III (45%) kivételével, 50-70 %-os kitermeléssel kaptam meg a tiszta, elágazó láncú GnRH-III származékokat.

#### 5.2.2.2 GnRH-III(NH<sub>2</sub>-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO) szintézise

Az oldalláncán hidrazidot tartalmazó GnRH-III származék szintézisekor első lépésben Boc-NH-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOPcp előállítására volt szükség. Ennek érdekében Boc-NH-NH<sub>2</sub>-t reagáltattam glutársav-anhidriddel dimetilformamidban egy napig szobahőmérsékleten. Ezt követően pentaklórfenollal reagáltattam az intermediér terméket DCC jelenlétében dioxánban három órán keresztül, mely során a kívánt termék keletkezett (Boc-NH-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOPcp). Megmértem a kapott anyag olvadáspontját (o.p.: 152-154°C), valamint meghatároztuk a klórtartalmát (számított érték: 36,9%, mért érték: 36,4%). A Boc-NH-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOPcp peptidhez történő kapcsolását dimetilformamidban végeztem. A hidrazid származékból peptidre nézve ekvivalensnyi mennyiséget használtam, és egy napos kapcsolást alkalmaztam. A kapcsolást követően a hidrazid származék Boc védőcsoportját távolítottam el, TFA-víz-EDT (95:2,5:2,5, v/v/v) elegy alkalmazásával szobahőmérsékleten (19. ábra). Ezt követően a hidrazidot tartalmazó GnRH-III származék tisztítását szemipreparatív RP-HPLC-vel végeztem.

#### 5.2.2.3 Elágazó láncú GnRH-I származék szintézise

Az elágazó láncú GnRH-I származékot MBHA gyantán (500 mg, 1,04 mmol/g gyantakapacitás) építettem fel. A szintézis során a C-terminális első négy aminosavát (Boc-Gly-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Arg(Tos)-OH és Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O), majd Fmoc-D-Lys(Boc)-OH származékot kapcsoltam a peptid-gyantához. Az oldallánc kiépítéséhez az elágazó láncú GnRH-III származékokhoz hasonlóan Boc/Bzl stratégiát alkalmaztam Boc-Gly-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Leu-OH·H<sub>2</sub>O aminosavak felhasználásával.

A peptid további részét Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégiával szintetizáltam; a lizin Fmoc védőcsoportját eltávolítottam, majd Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Trp-OH Fmoc-His(Trt)-OH és Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH aminosavszármazékok felhasználásával felépítettem a molekulákat.



Végül, a természetes peptidekhez hasonlóan, védőcsoportot nem tartalmazó piroglutaminsavat kapcsoltam a molekulák *N*-terminálisára.

A lineáris származékok esetében leírt kétlépéses hasítási protokoll alkalmazásával kaptam meg az elágazó láncú szabad peptidet.

Az elágazó láncú GnRH-I származékból klóracetilcsoportot tartalmazó analógra volt szükség a további szintézisekhez, ezért a trifluorecetsavas hasítási lépés után a gyantakapacitásra számolt 5 ekvivalens ClAc-OPcp-vel 2 órán át szobahőmérsékleten reagáltattam. Végül a gyantán lévő peptidet ekzikatorban egy éjszakán keresztül szárítottam.

A gyantáról történő végső hasítást hidrogénfluoriddal végeztem *p*-krezol és 1,4-*DL*-ditiotreitól (HF-*p*-krezol- *p*-tiokrezol = 10 ml: 0,5 g: 0,5 g) jelenlétében másfél órán át 0°C-on. A hasítást követően az 5.1.2. fejezetben leírtak szerint jártam el. A kapott 500 mg nyers terméket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A tisztítást követően az oldalláncot tartalmazó GnRH-I származékot kémiaiailag jellemeztem a további felhasználás előtt (17. ábra és 2. táblázat). Ez a származék igen alacsony, 40%-os kitermeléssel volt előállítható.

### 5.2.3 Radioaktívan jelölt GnRH származékok szintézise

Receptorhoz való kötődési képesség méréséhez radioaktívan jelölt GnRH származékok ( $[\Delta\text{Pro}^9]\text{GnRH-I}$ ,  $[\Delta\text{Pro}^9]\text{GnRH-II}$  és  $[\Delta\text{Pro}^9]\text{GnRH-III}$ ) szintézisére volt szükség.

A szintézist szilárdfázisú peptidszintézis módszerével, manuálisan, vegyes Boc/Bzl-Fmoc/<sup>t</sup>Bu stratégia alkalmazásával valósítottam meg MBHA gyantán (200 mg, 1,2 mmol/g).

A GnRH származékok szintézisét a natív molekulák szintézisével azonos módon végeztem azzal a kivétellel, hogy a molekulák kilencedik pozíciójába a prolin helyére 3,4-dehidro-prolint építettem be, amely alkalmassá teszi a molekulákat a tríciummal való jelölésre.

A szintézist és hasítást követően szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam meg a nyers termékeket, majd analitikailag jellemeztem őket retenciós idejük és molekulatömegük alapján (4. táblázat). A kapott triciálásra alkalmas nyers peptidek tisztasága GnRH-I esetében 66%, míg a GnRH-II és GnRH-III peptidek esetében 55% volt. Az analitikailag jellemzett peptidek triciálását a MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében Dr. Tóth Géza segítségével végeztem.

A GnRH származékokból 2  $\mu\text{mol}$  ( $[\Delta\text{Pro}^9]\text{GnRH-III}$ : 3,20 mg,  $[\Delta\text{Pro}^9]\text{GnRH-II}$ : 2,93 mg) mennyiséget mértünk ki, ehhez adtunk 10 mg PdO/BaSO<sub>4</sub>-ot, mint katalizátort és 1,5 ml dimetilformamidot. A reakcióedényt cseppfolyós N<sub>2</sub>-nel behűtöttük, a triciáláshoz pirofóros

UT<sub>3</sub>-ból felszabadított trícium gázt használtunk. A reakció követését a nyomásváltozás mérésével végeztük. A reakció a 9. percben indult be, amikor a PdO katalizátor megfeketedett. A reakció GnRH-III esetén 80, GnRH-II esetén pedig 90 perc alatt játszódott le, ekkor már nem változott a nyomás. Ezt követően a reakcióelegyet leszűrtük, 1% ecetsav oldattal leoldottuk a szűrőről a jelölt peptidet, majd vakuum bepárlással eltávolítottuk az ecetsavat. A labilis <sup>3</sup>T eltávolítása céljából feloldottuk újra a peptidet 1% ecetsav oldatban, és újra bepároltuk. Ezt megismételtük még kétszer.

A kapott nyers jelölt peptideket 1% ecetsavban feloldottuk (~ 20 ml), majd 8·10<sup>5</sup>-esére hígítottuk 1% ecetsavas oldattal, és ebből a hígított oldatból 50 µl-nyit toluolos szcintillációs koktéllba tettünk és mértük az aktivitását.

A nyers termékek aktivitására GnRH-III esetén 75 mCi, GnRH-II esetén 108 mCi-t kaptunk.

Ezt követően analitikai RP-HPLC rendszeren radioaktív detektor alkalmazásával tisztítottuk meg a peptid egy részét (oszlop típusa: Vydac 218TP54, C18; Eluensek: A-eluens: víz/ 0,1% TFA, B-eluens: acetonitril/ 0,1% TFA; Gradiens: 0-5 perc: 4% B, 5-20 perc: 12% B, 20-25 perc: 15% B, 25-45 perc: 25% B, folyási sebesség: 1 ml/perc).

A tisztított jelölt peptidek specifikus aktivitását a radioaktivitásból és a peptid mennyiségének hányadosából határoztuk meg, mely [(<sup>3</sup>H)Pro<sup>9</sup>]GnRH-III esetében 44 Ci/mmol, míg [(<sup>3</sup>H)Pro<sup>9</sup>]GnRH-II esetében 59 Ci/mmol volt.

## **5.2.4 GnRH-III származékok dimerizációja**

### **5.2.4.1 Szimmetrikus dimerek előállítása**

A tisztított, jellemzett ciszteinnel meghosszabbított tetrapeptid spacert (H-CGFLG- és Ac-CGFLG-) tartalmazó peptideket 0,1 M Tris-pufferben oldottam (pH 8,1) oly módon, hogy a peptidkoncentráció 10 mg/ml legyen. Az oxidáció szobahőmérsékleten a levegő oxigénjének hatására kevertetés mellett az acetilcsoport nélküli származék esetében egy, míg az acetilezett forma esetében két nap alatt lejátszódott. A reakció követését analitikai RP-HPLC-vel valósítottam meg. A dimerizáció lejátszódását követően a reakcióelegyet megsavanyítottam (pH 3) és szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. Mindkét dimer származékot kémiaiilag jellemeztem analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével (20 ábra és 5. táblázat). A szimmetrikus dimerek 78% ([GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub>) és 75%-os ([GnRH-III(Ac-CGFLG)]<sub>2</sub>) kitermeléssel állíthatók elő.

#### 5.2.4.2 Aszimmetrikus dimerek előállítása

A tisztított, jellemzett megfelelő GnRH származékokat Tris-pufferben (0,1 M, pH 8,1) oldottam oly módon, hogy a peptidkoncentráció 10 mg/ml legyen. Az egyes aszimmetrikus dimerek képződéséhez szükséges peptidmennyiségeket a 21. táblázat foglalja össze. A tioéterkötés a cisztein tartalmú peptidszármazék és a klóracetilezett molekula között szobahőmérsékleten kevertetés mellett két nap alatt kialakult, hasonlóan a szimmetrikus dimerekhez. A reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem. A tioéterkötés kialakulásának lejátszódását követően a reakcióelegyet megsavanyítottam TFA-oldattal (pH 3) és szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. Mindegyik dimer származékot kémiaiilag jellemeztem retenciós idejük és molekulatömegük alapján (6. táblázat), szerkezetüket az 21. ábra mutatja. Az aszimmetrikus dimerek, a két enzimlabilis tetrapeptid szekvenciát tartalmazó aszimmetrikus dimer ([D-Lys<sup>6</sup>(GFLG-CO-CH<sub>2</sub>-S-((Ac-CGFLG)GnRH-III)]GnRH-I) kivételével (33%), 50-75%-os kitermeléssel állíthatók elő.

21. táblázat: Az aszimmetrikus dimerek előállításához szükséges anyagmennyiségek

Aszimmetrikus dimer kódja	GnRH származék	anyagmennyiség (μmol)	tömeg (mg)
<b>SzI-1</b>	[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	29	36
	GnRH-III(CIAc-GFLG)	29	50
<b>SzI-2</b>	[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-I	37	45
	GnRH-III(CIAc)	37	50
<b>SzI-3</b>	[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	37	48
	GnRH-III(CIAc)	37	50
<b>SzI-4</b>	[D-Cys <sup>6</sup> ]GnRH-II	29	37
	GnRH-III(CIAc-GFLG)	29	50
<b>SzI-5</b>	[D-Lys <sup>6</sup> (CIAc-GFLG)]GnRH-I	28	48
	GnRH-III(Ac-CGFLG)	28	50
<b>SzI-6</b>	[D-Lys <sup>6</sup> (CIAc-GFLG)]GnRH-I	36	61
	GnRH-III(Ac-C)	36	50

#### 5.2.4.3 Fluoreszcensen jelölt GnRH-III származékok szintézise

Sejtbejutási vizsgálatokhoz fluoreszcensen jelölt GnRH-III származékok szintézisére volt szükség. Fluoreszcens festékként az 5(6)-karboxifluoreszceint választottam, és az alábbi jelzett GnRH-III származékot állítottam elő: CF-GnRH-III, karboxifluoreszceinnel jelölt GnRH-III fragmens peptidek és CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> (20. ábra). A szabad oldalláncbéli N<sup>α</sup>-aminocsoportot tartalmazó dimert [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> (50 mg, 14 μmol), a GnRH-III (15 mg, 14 μmol), valamint a GnRH-III(2-10) (14 mg, 14 μmol), a GnRH-III(3-10) (13 mg, 14 μmol), és a GnRH-III(4-10) (12 mg, 14 μmol) fragmens peptideket feloldottam dimetilformamidban (peptidkoncentráció: 5 mg/ml), két ekvivalens CF-OPcp<sup>202</sup> (17 mg, 28

$\mu\text{mol}$ ), és két ekvivalens DIEA ( $5\ \mu\text{l}$ ,  $28\ \mu\text{mol}$ ) hozzáadásával a fluoreszceines jelölés szobahőmérsékleten állandó kevertetés mellett két nap alatt lejátszódik. A pontos anyagmennyiségeket a 21. táblázat foglalja össze. A reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem. A reakció lejátszódásakor TFA-oldattal megsavanyítottam a reakcióelegyet (pH 3), és szemipreparatív RP-HPLC-vel megtisztítottam. A tiszta, jelölt peptideket analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével jellemeztem, azonosítottam (22. ábra és 7. táblázat). A fluoreszcensen jelölt származékok kitermelése 70-80% volt.

### 5.2.5 Hatóanyag molekula funkcionálizálása

A glutarát származék előállításához első lépésben a doxorubicin cukor részén lévő aminocsoportot kell védeni Fmoc védőcsoporttal. Ebben a reakcióban a hidroklorid só formájában lévő hatóanyagot ( $50\ \text{mg}$ ,  $86\ \mu\text{mol}$ ) reagáltattam Fmoc-OSu reagenssel ( $30\ \text{mg}$ ,  $90\ \mu\text{mol}$ ) DIEA ( $30\ \mu\text{l}$ ,  $172\ \mu\text{mol}$ ) jelenlétében  $1\ \text{ml}$  dimetilformamidban. Három óra elteltével 0,1% TFA/víz elegyével kicsaptam, mostam hideg éterrel az Fmoc-OSu eltávolítása céljából, majd szárítottam a terméket (94% kitermelés). Az így előállított Fmoc-védett hatóanyag molekulát glutársav-anhidriddel ( $11,4\ \text{mg}$ ,  $100\ \mu\text{mol}$ ) egy éjszakán át reagáltattam  $1\ \text{ml}$  dimetilformamidban DIEA ( $26,1\ \mu\text{l}$ ,  $150\ \mu\text{mol}$ ) jelenlétében. Az oldószert eltávolítva kicsaptam a terméket, 75 %-os kitermeléssel megkaptam az Fmoc-Dox-14-*O*-hemiglutarátot (24. ábra)<sup>163</sup>.

Előállítottam továbbá a hatóanyag molekulák cukor részének aminocsoportján funkcionalizált származékot is. Ebben az esetben az Fmoc-védés kihagyásával közvetlenül reagáltattam a Dox, illetve Dau hatóanyag molekulákat glutársav-anhidriddel DIEA jelenlétében a fent leírt recept alapján egy éjszakán át szobahőmérsékleten (25. ábra).

Az így előállított származékokat használtam fel az észterkötést, és amidkötést tartalmazó hatóanyag konjugátumok előállítására.

Továbbá előállítottam a daunorubicin oxim származékát is (26. ábra). A reakcióban daunorubicint ( $50\ \text{mg}$ ,  $86\ \mu\text{mol}$ ) reagáltattam ekvivalens mennyiségű aminosavval ( $7,76\ \text{mg}$ ,  $86\ \mu\text{mol}$ ) DMF-0,2 M NaOAc (1:1 v/v) elegyében (koncentráció daunorubicinre nézve:  $5\ \text{mg/ml}$ )  $24\ \text{óra}$  alatt szobahőmérsékleten. A nyers terméket szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam. A funkcionlizált hatóanyagmolekulák analitikai paramétereit 8. táblázat foglalja össze.

### 5.2.6 Hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok szintézise

Az észterkötést tartalmazó konjugátum előállításához a fent leírt glutársav-anhidriddel előállított, peptidre számított 4 ekv. Fmoc-Dox-14-*O*-glutarát (106 mg, 160  $\mu$ mol) származékot reagáltattam oldatfázisban a lineáris GnRH-III molekulával (50 mg, 40  $\mu$ mol) 4 ekv. BOP (71 mg, 160  $\mu$ mol), 4 ekv. HOBt (24 mg, 160  $\mu$ mol) és 8 ekv. DIEA (54  $\mu$ l, 320  $\mu$ mol) jelenlétében dimetilformamidban egy órán át 20 mg/ml peptidkoncentrációt alkalmazva. A reakció végén megtisztítottam a konjugátumot, elválasztva az el nem reagált kiindulási anyagoktól, szemipreparatív RP-HPLC-vel. Ezt követően eltávolítottam az Fmoc védőcsoportot a doxorubicin cukor részén lévő aminocsoportjáról 35% piperidin/DMF oldattal.

Az észterkötésű konjugátumokból előállítottam oldalláncot tartalmazó GnRH-III(GFLG) molekula (50 mg, 31  $\mu$ mol) felhasználásával 4 ekv. Fmoc-Dox-14-*O*-glutarát (82 mg, 124  $\mu$ mol) és 4 ekv. BOP (55 mg, 124  $\mu$ mol), 4 ekv. HOBt (19 mg, 124  $\mu$ mol) és 8 ekv. DIEA (42  $\mu$ l, 248  $\mu$ mol) jelenlétében a fent leírtakkal azonos körülmények között enzimlabilis távtartóval rendelkező hatóanyagot tartalmazó konjugátumot is (27. ábra).

A hatóanyag molekula (Dau) oxocsoportja (20 mg, 35  $\mu$ mol) és a peptid hidrazincsoportja (48 mg, 35  $\mu$ mol) között hidrazonkötés alakítható ki az oximkötés kialakításával azonos körülmények között: szobahőmérsékleten NaOAc-pufferben (0,2M, pH 4,8) 2 nap alatt (28. ábra).

Az oldalláncában aminooxics csoportot tartalmazó GnRH-III molekula (60 mg, 35  $\mu$ mol) és a daunorubicin (20 mg, 35  $\mu$ mol), illetve doxorubicin (20 mg, 35  $\mu$ mol) hatóanyagmolekulák oxocsoportja között 0,2M nátrium-acetát pufferben (pH 4,8) szobahőmérsékleten állandó kevertetés mellett 24 óra alatt oximkötés kialakulásával járó kémiai ligáció jön létre. A reakció során 3 mg/ml peptidkoncentrációt alkalmaztam (29. ábra).

Az amidkötésű konjugátumok előállításakor az előzetesen előállított cukor rész aminocsoportján funkcionáliszt Dau (31 mg, 48  $\mu$ mol)-, illetve Dox-*N*-hemiglutarátot (31 mg, 48  $\mu$ mol) használtam fel az elágazást nem tartalmazó GnRH-III peptidhez (60 mg, 48  $\mu$ mol) történő konjugációban (28. ábra). Az amidkötés kialakításához szükség volt még a peptidre számított 4 ekv. BOP (85 mg, 192  $\mu$ mol), 4 ekv. HOBt (29 mg, 192  $\mu$ mol) és 8 ekv.

DIEA (66  $\mu$ l, 384  $\mu$ mol) reagensekre. A hatóanyagok funkcionizált származékait dimetilformamidban reagáltattam 12 órán keresztül. A peptidkoncentráció 20 mg/ml volt.

Az amidkötésű konjugátumokból előállítottam elágazó láncot tartalmazó származékokat is, amelyhez az oldallánccal rendelkező GnRH-III molekulát (60 mg, 37  $\mu$ mol) reagáltattam Dau (21 mg, 37  $\mu$ mol)-, illetve Dox-*N*-hemiglutarát (21 mg, 37  $\mu$ mol) hatóanyagszármazékkal a peptidre számított 4 ekv. BOP (65 mg, 148  $\mu$ mol), 4 ekv. HOBt (23 mg, 148  $\mu$ mol) és 8 ekv. DIEA (48  $\mu$ l, 296  $\mu$ mol) jelenlétében dimetilformamidban (30. ábra).

Az összes reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem. A konjugációk végén az oxim-, észter- és amidkötést tartalmazó konjugátumokat TFA-oldattal való savanyítás után szemipreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam meg. Mivel a hidrazonkötés rendkívül érzékeny a savas közegre, a 0,1% TFA-t tartalmazó HPLC eluensek alkalmazásával a konjugátum elbomlana. Ezért ezt a konjugátumot gelszűrőssel (G15, eluens: 0,2 M ammónium-acetát puffer) tisztítottam meg. Az egyes konjugációk az alábbi kitermeléssel mentek végbe: legjobb kitermelést az amidkötésű konjugátum esetén lehet elérni, 70-80%; az oximkötést tartalmazó: 50%; az észterkötésű 35-40%, végül a hidrazonkötéssel rendelkező konjugátumok keletkeztek a legalacsonyabb kitermeléssel, 30%. A konjugátumok analitikai paramétereit (retenciós idő, molekulatömeg) meghatároztam analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel (9. táblázat).

### **5.3 Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum enzimatisz stabilitása**

Az emésztési vizsgálatokat Marilena Manea végezte a Konstanz Egyetem Kémiai Tanszékén lévő Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratóriumában.

#### **5.3.1 GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum emésztése kimotripsinnel**

A kísérlet során feloldotta a konjugátumot 0,01 M  $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazó 0,1 M Tris-HCl-ban (pH 7,8) oly módon, hogy a peptidkoncentráció 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  legyen. Ezt követően az  $\alpha$ -kimotripsinből (borjú hasnyálmirigyből kivont, TLCK kezelt; Sigma, Saint Louis, MO; c = 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1 mM HCl tartalmú 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) oldatot készített, és 1:50 (m/m%) enzim: szubsztrát arányban összekeverte a két oldatot. A reakcióelegyet 37°C-on inkubálta, és 5, 15, 30 perc, illetve 1, 3, 6, 24 és 72 óra elteltével vett mintákat. Az emésztési reakciót 1  $\mu\text{l}$ , 1 M HCl-oldattal állította le, ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben fagyasztotta le. Az emésztés során vett minták összetételét analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrometriával vizsgálta. A mintákból 20  $\mu\text{l}$ -nyit injektált a HPLC oszlopra, és az összegyűjtött frakciókat MALDI-TOF tömegspektrométerrel azonosította (Bruker Biflex<sup>TM</sup> nitrogén UV lézert ( $\lambda$ =

337 nm) tartalmazó lineáris TOF tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)). Mátrixként  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsavval telített acetonitril/ 0,1% trifluorecetsav/ víz (2:1, v/v) oldatot használt) (31. ábra és 10. táblázat).

### **5.3.2 GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum stabilitásvizsgálata 90% humán szérumban**

A szérumban végzett stabilitási vizsgálatokhoz először a konjugátumot vízben feloldotta, majd humán szérumot adott hozzá (peptid végkoncentráció: 25  $\mu$ M). Az elegyet 37°C-on inkubálta. 200  $\mu$ l-nyi mintát vett a következő időpontokban: 0 perc, 6, 24 és 48 óra. A mintákban a lezajló reakciókat 200  $\mu$ l, 0,1% TFA-víz (pH 2,5) oldattal állította le. A tömegspektrometriás azonosítás előtt a 30 kDa-nál nagyobb humán szérumban lévő proteinek Microcon rendszer alkalmazásával eltávolította, valamint a 30 kDa-nál kisebb proteinek „ZipTip C<sub>18</sub> clean-up” módszerrel sótalanította. Kontrollként a vízben oldott GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot (c= 25  $\mu$ M) használta, melyet ugyancsak 37°C-on inkubált. Ebből az oldatból is mintát vett 24 és 48 óra elteltével, és MALDI-TOF tömegspektrométer segítségével azonosította (Bruker Biflex<sup>TM</sup> nitrogén UV lézert ( $\lambda$ = 337 nm) tartalmazó lineáris TOF tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)). Mátrixként  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsavval telített acetonitril/ 0,1% trifluorecetsav/ víz (2:1, v/v) oldatot használt). A spektrumokat pozitív és negatív módban egyaránt felvette (31. ábra és 10. táblázat).

### **5.3.3 GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum stabilitásvizsgálata humán katepszin B-vel szemben**

A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumot 0,01 M DTT-tartalmú 0,1 M NaOAc-pufferben (pH 5) feloldotta oly módon, hogy a peptidre nézve 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l koncentrációjú oldatot kapjon. Ehhez az oldathoz humán májból izolált katepszin B (Calbiochem, Németország) enzimet adott, melyet 20 mM NaOAc-pufferben (1 mM EDTA tartalmú, pH 5) oldott. Az enzimet tartalmazó oldat koncentrációja 0,4  $\mu$ g/ $\mu$ l volt. Az alkalmazott enzim:szubsztrát koncentráció 1:50, m/m%. Az előző stabilitási vizsgálatokhoz hasonlóan az oldatot 37°C-on inkubálta és különböző időközönként (5 perc, 2, 4, 8, és 24 óra) 20  $\mu$ l-nyi mintát vett a reakcióelegyből. Ezekhez a mintákhoz - az enzim hasításának leállítása céljából - 2  $\mu$ l ecetsavat adott és folyékony nitrogénnel lefagyasztotta azokat. Az emésztett mintákat LC/MS rendszer alkalmazásával analizálta. Kontrollként enzim nélkül 37°C-on 24 órán keresztül inkubált, 0,01 M DTT-t tartalmazó 0,1 M NaOAc-pufferben (pH 5) oldott 0,1

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  koncentrációjú GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum szolgált (32. ábra és 10. táblázat).

#### **5.4 GnRH-III származékok endokrin hatásának tanulmányozása patkány hipofízis sejteken**

A méréseket a Pécsi Orvostudományi Egyetem Anatómiai Intézetében végezték. A GnRH-III származékok hatását vizsgálták patkány hipofízis sejtek LH-szekrúciójára<sup>216</sup>. A hipofízis sejtek kevert populációját négy szabályos ciklusú nőstény Wistar patkány hipofízis sejtjeiből preparálták és a szuperfúziós készülék minden kamrájába tettek ezekből a sejtekből. Különböző koncentrációkat (10, 100 és 1000 nM) alkalmaztak a GnRH-III származékokból és a sejtekre tették váltakozva 6 percen keresztül. A kifolyó médiumból egy milliliternyi frakciót gyűjtöttek össze minden 6. percben. Az LH mennyiségét RIA segítségével határozták meg. A vizsgálathoz szükséges anyagokat a National Hormone and Pituitary Program (Rockville, MD; patkány LH-11 ellenanyag, LHRP- 3 referencia készítmény, valamint jódozáshoz az LH-I-9 hormon) révén szerezték be. A mérések szórása kisebb, mint 10%. A szuperfúziós eredményeket a Pécsi Orvosi Egyetem Anatómiai Intézetének saját fejlesztésű szoftverével értékelték ki<sup>217</sup>. A kapott csúcsokat elemezték és meghatározták az alapvonal feletti LH-szekrúció nettó integrált értékét. A vegyület hatására bekövetkezett LH-szekrúció választ az alapszinthez viszonyított százalékos növekedésként fejezték ki. Minden kísérletet két, illetve három alkalommal ismételték meg; az eredményeket, mint érték  $\pm$  szórás adták meg. Az adatok statisztikai elemzését *t*-tesztet követő egyszempontos variancia analízis (one-way ANOVA) módszerrel végezték el SigmaStat szoftver alkalmazásával (Jandel, San Rafael, CA). A különbségeket szignifikánsnak tekintették, amennyiben  $p < 0,05$  volt (11. táblázat).

#### **5.5 Kötődésvizsgálat**

A kötődésvizsgálatokat az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztály Izotóp laboratóriumában végezték. A vizsgálathoz az általam készített tríciummal jelölt peptideket ( $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]\text{GnRH-III}$  és  $[(^3\text{H})\text{Pro}^9]\text{GnRH-II}$ ) használták és a GnRH származékok GnRH-I receptorhoz való kötődési képességét tumoros szövetminták membránfrakciójának felhasználásával határozták meg.

A mintaelőkészítés során a T-47D humán emlő-, a HT-29 humán vastagbél- és a C26 eger vastagbél tumor mintákat (1-2 gramm) folyékony nitrogénben lefagyasztották, majd mikrodisszeminátorral elporították. Az elporított szövetekből, 10% glicerint tartalmazó 0,01M Tris-pufferrel (pH 7,4) szuszpenziót készítettek. A sejtmagot eltávolították centrifugálással (2500 rpm, 10 perc, 4°C), az így kapott felülúszót további centrifugálásnak vetették alá



(40000 rpm, 30 perc). A centrifugálást követően eltávolították a felülúszót, és a sejtmagot már nem tartalmazó durva membránfrakciót mosták, majd 0,1% BSA tartalmazó 0,02M HEPES-pufferrel (pH 7,5) szuszpenziót készítettek. A membránszuszpenziók fehérje koncentrációja 1,53-2,12 mg/ml között volt. Ebből 300-300 µl membrántartalmú szuszpenziót [<sup>3</sup>H]Pro<sup>9</sup>]GnRH-III, illetve [<sup>3</sup>H]Pro<sup>9</sup>]GnRH-II származékkal (telítési koncentráció: 0,5-5 nM) és a megfelelő radioaktív jelölést nem tartalmazó GnRH származékokkal (0,1-1 µM) inkubálták 2% BSA-val előkezelt polipropilén csőben 75 percig 4°C-on. Az inkubálást követően 0,3 ml 4°C-os puffert adtak minden csőhöz és centrifugálták azokat (15000 rpm, 10 perc, 4°C), majd a felülúszót eltávolították és szcintillációs koktélt (UltimaGold XR) hozzáadva, 1450 WALLAC MicroBeta Trilux szcintillációs mérőműszerrel meghatározták az üledék radioaktivitását. A specifikus kötődést a megfelelő nem radioaktív GnRH származék nélkül (összes kötődés), illetve annak jelenlétében (nem specifikus kötődés) végzett mérés során kapott radioaktivitás különbségével határozták meg (12. és 13. táblázat). A fehérje koncentráció mérése Qubit fluorométerrel történt.

## **5.6 Sejtbejutási vizsgálatok**

### **5.6.1 GnRH-III és szimmetrikus dimer származékok sejtek általi felvételének vizsgálata áramlási citometriával**

Az MCF-7 és HT-29 sejteket az 5.1.4. fejezetben leírt körülmények között tenyésztettük. A sejtbejutási vizsgálatokhoz szükséges kezeléseket fluoreszcensen jelölt GnRH-III monomer és dimer analógokkal, 24 lyukú sejtenyésző lemezen végeztük. Az alkalmazott sejtek mennyisége: 10<sup>5</sup> sejt/lyuk volt. A kísérletet megelőző nap kiosztottuk a sejteket a lemezre. A 24 órás 37°C-on történő inkubálást követően a sejteket hat órán át kezeltük a jelölt GnRH származékokkal 79,2 - 132 µM koncentráció tartományban. Kontrollként szérumentes médiummal (SFM) hat órán át kezelt sejteket használtunk. Az inkubációt követően a kezelőoldatot eltávolítottuk a sejtekről, és 100 µl tripszin-EDTA oldatot adtunk hozzájuk, majd 10 percig 37°C-on inkubáltuk vele azokat. A tripszint 900 µl 10% FCS-t tartalmazó HPMI oldattal (glükóz, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, HEPES, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O) inaktiváltuk és a sejteket a lemezről FACS-csőbe tettük át, ezután centrifugáltuk őket (1000 rpm, 5 perc, 4°C), a felülúszót eltávolítottuk és a sejteket 500 µl HPMI-ben vettük fel. A kezelést és mintaelőkészítési lépéseket követően az MCF-7 és HT-29 sejtek fluoreszcencia intenzitásának, ezáltal a jelölt peptidek sejtbejutási képességének meghatározását áramlási citometriával határoztuk meg (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA). Az adatokat FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel (33. ábra).

### **5.6.2 Rövidített GnRH-III szekvenciák sejtbejutási képességének vizsgálata áramlási citometria módszerével**

A kísérlethez HT-29 sejtekből lyukanként  $10^5$  sejtet osztottunk ki 24 lyukú lemezre a kezelést megelőző napon. A fluoreszcenciával jelölt fragmentumokat a megfelelő szérumban oldottuk fel, hígítási sort készítettünk a fragmentumok 0,5 mg/ml-es törzsoldatából (CF-GnRH-III:  $2,6 \cdot 10^{-3}$ -26  $\mu$ M; CF-GnRH-III(2-10):  $2,8 \cdot 10^{-3}$ -28  $\mu$ M, CF-GnRH-III(3-10):  $3,1 \cdot 10^{-3}$ -31  $\mu$ M, CF-GnRH-III(4-10) esetén  $3,8 \cdot 10^{-3}$ -38  $\mu$ M). Kontrollként szérumban kezelt sejteket alkalmaztunk. A három órás kezelés végén, eltávolítottuk a kezelő oldatokat a sejtekről, mostuk őket szérumban mediummal. A sejtek egyik felét sejtkaparó segítségével távolítottuk el a lemezről, míg a másik felét tripszinnel kezeltük. Erre azért volt szükség, mert ennek a két módszernek a segítségével meg tudjuk különböztetni a sejtfelszínhez kötött (sejtkaparási), és a sejtbe bejutott (tripszin) molekulákat. Majd a fent leírt módon előkészítettük a citometriás méréshez (34. és 35. ábra).

### **5.6.3 A humán GnRH-I hatásának vizsgálata a fluoreszcenciával jelölt GnRH-III monomer és dimer származékainak sejtbejutására**

A sejtfelvételi vizsgálatokhoz hasonlóan MCF-7, HT-29 és C26 sejtekből lyukanként  $10^5$  sejtet osztottunk ki 24 lyukú lemezre a kezelést megelőző napon. A sejteket előkezeltük humán GnRH-I 5 mg/ml-es törzsoldatából készített különböző koncentrációjú oldataival (14, 71, 141 és 291  $\mu$ M) vagy szérumban mediummal (negatív kontrol) 30 percig. Az előkezelt és a negatív kontrol sejtheihez adtuk a fluoreszcenciával jelölt GnRH-III (CF-GnRH-III) 1 mg/ml (12  $\mu$ M), illetve CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> 0,5 mg/ml-es (10  $\mu$ M) törzsoldatát, amelyeket a sejteknek megfelelő szérumban oldottunk fel. Hat óra elteltével vizsgáltuk az előkezelés hatását a monomer és dimer konjugátumok sejtbejutási képességére. Mind az előkezelt, mind pedig a negatív kontrol sejthei esetében vizsgáltuk 6 órán át szérumban mediummal kezelt sejtek fluoreszcenciáját is. (Az adatok kiértékelése során ezeknek a sejteknek a fluoreszcencia intenzitását hasonlítottuk össze azokéval, amelyeket GnRH-III monomer és dimer konjugátumaival kezeltünk.) A kezelést követően a sejteket az előbbiekben leírt protokoll szerint készítettük elő az áramlási citometriás méréshez. Az adatokat FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel (36. és 37. ábra).

#### **5.6.4 A [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> hatásának tanulmányozása a fluoreszcensen jelölt [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> sejtbefutására**

A humán GnRH-I peptiddel végzett kompetíciós vizsgálatokhoz hasonlóan MCF-7 sejtekből lyukanként  $10^5$  sejtet osztottunk ki 24 lyukú lemezre a kezelést megelőző napon. A sejteket előkezeltük [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> 2,5 mg/ml-es törzsoldatából különböző mennyiséget (12, 24, 36 és 48  $\mu$ M) véve, vagy szérummentes médiummal (negatív kontrol) 30 percig. Az előkezelt és a negatív kontrol sejtjeihez adtuk a fluoreszceninnel jelölt GnRH-III dimer (CF-[GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub>) 3,5  $\mu$ M koncentrációjú oldatát, amelyeket a sejteknek megfelelő szérummentes médiumban oldottunk fel. Hat óra elteltével vizsgáltuk az előkezelés hatását a konjugátumok sejtbefutási képességére. Mind az előkezelt, mind pedig a negatív kontrol sejtjei esetében vizsgáltuk 6 órán át szérummentes médiummal kezelt sejtek fluoreszcenciáját is. (Az adatok kiértékelése során ezeknek a sejteknek a fluoreszcencia intenzitását hasonlítottuk össze azokéval, melyeket [GnRH-III(CGFLG)]<sub>2</sub> dimer származékkal kezeltünk.) A kezelést követően a sejteket az előbbieken leírt protokoll szerint készítettük elő az áramlási citometriás méréshez. A mérés adatait FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel.

#### **5.6.5 Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok sejtek által történő felvétele**

A hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok esetén hasonlóan jártunk el, mint a szimmetrikus dimerek sejtbefutási vizsgálatainál. A kísérletek során MCF-7 és C26 sejteket használtunk. A konjugátumokat a megfelelő szérummentes médiumokban oldottuk fel. A GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot  $2,5 \cdot 10^{-4}$ -100  $\mu$ M koncentráció tartományban alkalmaztuk, míg a GnRH-III(Dox=Aoa-GFLG) konjugátumot  $2,5 \cdot 10^{-4}$ -200  $\mu$ M tartományban. Kontrollként inkomplett médiummal kezelt sejteket alkalmaztunk. A hat órás inkubálást követően a sejteket a szimmetrikus dimerek sejtfelvételi vizsgálatához hasonlóan előkészítettük az áramlási citometriás méréshez. A daunorubicin és doxorubicin okozta fluoreszcencia eltolódást kék lézer segítségével vizsgáltuk ( $\lambda = 488$  nm). Az adatokat FACSDiVa software segítségével elemeztük (38. ábra).

#### **5.7 Hatóanyagot tartalmazó konjugátumok DNS-hez való kötődésének vizsgálata fluoreszcencia spektroszkópia módszerével**

A vizsgálatokat az ELTE-TTK Biológiai Intézet Biokémiai Tanszékén végeztük. A spektrumokat Jobin Yvon Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel vettük fel. Gerjesztéshez

xenon lámpát használtunk. A kűvetta hőmérsékletét a mérés során 20°C-on tartottuk. A monokromátor optikai sávszélességét 4,25 nm-re állítottuk be. 0,1, 1, illetve 10  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatot készítettünk a daunorubicinből, a Dau=Aoa-OH-ból és a GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumból desztillált vízben. Valamennyi vizsgálat során a DNS (pmCherry-C1, plazmid DNS, emlős expressziós vektor, Clontech) végkoncentrációja 5  $\mu\text{g/ml}$  volt. Az optimális gerjesztési hullámhossz meghatározásához gerjesztési spektrumokat vettünk fel a vizsgált anyagokról. A gerjesztést 400 és 600 nm közötti hullámhossz tartományban végeztük. A gerjesztési spektrumok felvételéhez 560 nm-es emissziós hullámhosszt alkalmaztunk. A kapott gerjesztési spektrumok alapján a további vizsgálatokat 470 nm-en történő gerjesztéssel végeztük. Az emissziós spektrumok felvétele 485-650 nm közötti hullámhossz tartományban történt. A vizsgálatok megkezdése előtt felvettük az oldószer (desztillált víz) spektrumait. A későbbiek során ennek segítségével végeztük az anyagok spektrumainak korrekcióját. A DNS-hez való kötődés vizsgálatához első lépésként az anyagok spektrumait vettük fel a DNS jelenléte nélkül. Ezt követően az anyagok oldataihoz adtuk a DNS-t, és elvégeztük a mérést változatlan körülmények között. Minden mérést háromszor ismételtük, majd a kapott spektrumokat átlagoltuk. A 470 nm gerjesztési hullámhossz esetén kapott emissziós maximumokat meghatároztuk a mért adatok alapján. Az egyes anyagok, illetve a DNS-t tartalmazó és nem tartalmazó minták összehasonlításánál az emissziós maximumon kapott intenzitásokat vetettük össze (14. táblázat és 39. ábra).

## **5.8 GnRH-I receptor ellenes ellenanyag, illetve GnRH-I agonista ([D-Trp<sup>6</sup>]GnRH-I) hatása a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum sejtbefutására**

A fent leírt kompetíciós vizsgálatokhoz hasonlóan MCF-7 és C26 sejtekből  $10^5$  sejtet osztottunk ki lyukanként 24 lyukú lemezre a kezelést megelőző napon. Az ellenanyaggal végzett kompetíciós vizsgálatban a sejteket előkezeltük GnRH-I receptor elleni ellenanyaggal (1,2  $\mu\text{g/ml}$ ) (nyúl anti-humán poliklonális ellenanyag; LS-A209; MBL). A receptor agonistával végzett kísérlet során a [D-Trp<sup>6</sup>]GnRH-I végkoncentrációja 63 vagy 450  $\mu\text{M}$  volt. Mindkét esetben 30 perces előkezelést alkalmaztunk, negatív kontrollként szérumentes médiummal kezelt sejteket használtunk. Az előkezelt és a negatív kontrol sejteihez adtuk a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)) 0,16-100  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatait, amelyeket a sejteknek megfelelő szérumentes médiumban oldottunk fel. Hat óra elteltével vizsgáltuk az előkezelés hatását a konjugátumok sejtbefutási képességére. Mind az előkezelt, mind pedig a negatív kontrol sejtei esetében vizsgáltuk 6

órán át szérummentes médiummal kezelt sejtek fluoreszcenciáját is. (Az adatok kiértékelése során ezeknek a sejteknek a fluoreszcencia intenzitását hasonlítottuk össze azokéval, melyeket GnRH-III konjugátummal kezeltünk). A kezelést követően a sejteket az előbbieken leírt protokoll szerint készítettük elő az áramlási citometriás méréshez. A mérési adatokat FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel (40., 41. és 42. ábra).

### **5.9 Hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása**

A hatóanyagot tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározásához MCF-7, HT-29 és C26 sejteket használtunk. A sejteket a kezelést megelőző napon 96 lyukú lemezre osztottuk ki ( $5 \cdot 10^3$  sejt/lyuk) a megfelelő szérumtartalmú médiumban. A konjugátumokat  $5,1 \cdot 10^{-4}$ -100  $\mu$ M koncentráció tartományban vizsgáltuk. A konjugátumokat szérummentes médiumban oldottuk fel, és adtuk a sejtekhez. Kontrollként szérummentes médiummal kezelt sejteket használtunk. Hatórás 37°C-on való inkubálást követően a sejtekről eltávolítottuk a kezelő oldatot, kétszer mostuk a sejteket szérummentes médiummal, majd szérumtartalmú médiumot adtunk minden lyukba. A sejteket további 72 órán át 37°C-on tartottuk, majd meghatároztuk az élő sejtek számát MTT-teszt segítségével. A teszt elvégzésekor minden lyukhoz MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóliumbromid) oldatot adtunk (végső koncentrációja: 0,367  $\mu$ g/ml). Ezt követően a sejteket 3,5 órán át inkubáltuk 37°C-on az MTT-oldattal. Az inkubálás után centrifugáltuk a sejteket (2000 rpm, 5 perc, 4°C), majd a felülúszót eltávolítottuk. A lemez alján maradt kristályokat 100  $\mu$ l dimetilszulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, majd az optikai denzitást 540 és 620 nm-en mértük ELISA-reader (Labsystems MS Reader, Finnország) segítségével. Koncentrációnként négy párhuzamos mérést végeztünk, és minden mérést kétszer megismételtünk. Az adatok szignifikancia vizsgálatát Origin 7.5 Student-féle *t*-próbával végeztük el 95% konfidencia intervallum mellett (15. táblázat).

### **5.10 GnRH-III dimer származékainak apoptotikus hatása**

A kísérlethez MCF-7 és HT-29 sejtekből lyukanként  $10^5$  sejtet osztottunk ki 24 lyukú lemezre a kezelést megelőző napon. A szimmetrikus és aszimmetrikus GnRH-III dimer, valamint az azokat alkotó GnRH monomer származékokat a megfelelő szérummentes médiumban oldottuk fel (végkoncentráció 10  $\mu$ M). Kontrollként szérummentes médiummal kezelt sejteket alkalmaztunk. A hatórás kezelés végén, eltávolítottuk a kezelő oldatokat a sejtekről és azokat tripszinnel kezeltük. A sejteket FACS csőbe tettük és 1 ml hideg PBS-sel (foszfát-puffer pH 7,4) mostuk, majd 100  $\mu$ l hideg kötő-pufferben (10mM HEPES (pH 7,4),

140 mM NaCl, 2,5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA) felfuszpendáltuk és 5 µl FITC-annexin-V oldatot adtunk hozzájuk. Negatív kontrolként azok a sejtek szolgáltak a méréshez, melyekhez nem adtunk jelölt annexin-V molekulát. A sejtuszuspenziókat a jelölő anyaggal történő összekeverése után 15 percig hidegben, fénytől elzárt helyen inkubáltuk. Ezt követően 380 µl kötő puffert adtunk minden csőhöz és áramlási citométerrel vizsgáltuk őket. Az apoptotikus és nekrotikus sejteket propídium-jodid ( $3 \cdot 10^{-2}$  µM) segítségével különítettük el. Ennek érdekében minden csövet lemértünk egyszer jelölő anyaggal vagy anélkül, majd propídium-jodidot (PI) adva a csövekhez ismét megmértük őket (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA). A mérés során a halott sejtek négy populációját különítettük el; annexin-V és PI negatív-, annexin-V pozitív-, PI pozitív-, valamint az annexin-V és PI pozitív sejtek. Az adatokat FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel (16. táblázat).

### **5.11 GnRH-III származékok *in vitro* antiproliferatív hatása**

Ezeket a vizsgálatokat az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán végezték. A sejteket ( $10^5$ ) 60 mm átmérőjű Petri csészébe osztották ki, és a megfelelő GnRH-III származékokkal kezelték. A kezelés során alkalmazott koncentráció szimmetrikus dimerek esetén GnRH-III tartalomra nézve 5–100 µM, míg az aszimmetrikus dimerek esetében 50 µM volt. A sejteket 5% CO<sub>2</sub> mellett 37°C-on kultúrában tartották öt napig. A kezelést az első és a harmadik napon végezték. Az ötödik napon a sejteket tripszinnel távolították el a Petri csészéről és Neubauer-féle hemocitométerrel számolták meg azokat. Minden csoportban három párhuzamos mérést végeztek. A kezelt sejtek proliferációját a kontrol sejtek proliferációjához képest százalékosan határozták meg. A kontrol sejtek proliferációja 100%<sup>218</sup> (43. és 44. ábra).

### **5.12 GnRH-III származékok *in vivo* toxicitása és antitumor hatásának tanulmányozása**

#### **5.12.1 GnRH-III szimmetrikus dimerek *in vivo* antitumor hatása**

Ezekhez a kísérletekhez Balb/c egereket használtak, amelyekbe HT-29 sejteket ültettek be. Előzetesen meghatározták a dimerek *in vivo* toxicitását 40-400 mg/testsúly kg koncentráció tartományban (21 napos kísérlet). A kezeléseket a beültetést követő 10. napon kezdték el és az állatok hat héten át minden nap kaptak a vizsgált anyagokból. Az alábbi csoportok mindegyike hét egeret tartalmazott: 1.) kontrol; 2.) [GnRH-III(Ac-CGFLG)]<sub>2</sub> peptiddel; 3.) [GnRH-III(H-CGFLG)]<sub>2</sub> analóggal kezelt. Mindkét GnRH-III dimer származék

esetén, a kezelés során 40 mg/ testsúly kg dózist alkalmaztak i.p. adagolással. A vegyületeket intraperitoneálisan (i.p.) adagolták a kezelés 41. napjáig. Hat hét után az egereket még további húsz napig életben tartották, és a tumortérfogatot bizonyos időközönként mérték (45. ábra).

### **5.12.2 Daunorubicin és daunorubicin tartalmú konjugátum *in vivo* toxicitásának meghatározása**

A daunorubicint és a hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátumot (GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) desztillált vízben oldották fel. Az egereket egyszer i.p. kezelték 15 mg (26,6  $\mu$ M)/testsúly kg szabad daunorubicinnel, vagy ekvivalens daunorubicin tartalmú konjugátummal (62,5 mg/testsúly kg, 24% Dau tartalom).

A vizsgálatban résztvevő csoportok:

- 1) kontrol,
- 2) daunorubicinnel, illetve
- 3) hatóanyagot tartalmazó konjugátummal kezelt állatok.

A csoportok mindegyike öt egeret tartalmazott. Az anyagok beadása i.p. történt. A kezelés során bekövetkező toxicitást két paraméter segítségével határozták meg az alapján, hogy a kezelést követően az állatok mennyi ideig maradtak életben, illetve az egerek testsúly változása alapján (46. ábra).

### **5.12.3 Daunorubicin és daunorubicin tartalmú konjugátum *in vivo* antitumor hatása C26 karcinómán**

#### **5.12.3.1 1. kísérlet**

Az első kísérletben 3-4 mm méretű, körülbelül 25 mg tömegű C26 tumorszövetet ültettek be az állatok bőre alá. A kezeléseket a tumorbeültetést követő 7. napon kezdték el. A desztillált vízben oldott vegyületeket i.p. adagolták. A kísérletben öt csoportot különítettek el, melyek mindegyike 5 egérből állt:

- 1) kontrol
- 2) 5 mg (8,86  $\mu$ mol) daunorubicin /testsúly kg egyszeri adagolással;
- 3) 2 mg (3,55  $\mu$ mol) daunorubicin /testsúly kg kétnaponta, összesen ötször adva.
- 4) 15 mg (26,6  $\mu$ mol)/testsúly kg GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátumot egyszeri adagolással;

- 5) 5 mg (8,86  $\mu$ mol)/testsúly kg GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) konjugátum 5 alkalommal adva minden második napon.

A kezelési periódus alatt hét alkalommal ellenőrizték digitális tolómérővel a tumor méretét. A tumortérfogatot az egyes állatok esetén az alábbi formula segítségével határozták meg:  $V = \frac{a^2 \times b \times \pi}{6}$  (ahol „a” és „b” jelölik a legrövidebb és leghosszabb átmérőket) <sup>219</sup>. Minden csoport esetén meghatározták a tumor térfogatok átlagát és szórását (47. és 48. ábra).

### 5.12.3.2 2. kísérlet

A második kísérletben az elsőhöz hasonlóan 3-4 mm méretű, körülbelül 25 mg tömegű C26 tumorszövetet ültettek be az állatok bőre alá. A desztillált vízben oldott vegyületeket i.p. adagolták. A kísérletben négy csoportot különítettek el, melyek mindegyike hét egérből állt:

- 1) kontrol
- 2) 62,5 mg (26,6  $\mu$ mol) GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) /testsúly kg kétszeri adagolással a tumorbeültetést követő 4. és 7. napon;
- 3) 62,5 mg (26,6  $\mu$ mol) GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG) /testsúly kg kétnaponta, a tumorbeültetést követő 7. és 10. napon adva.
- 4) 45 mg (26,6  $\mu$ mol) GnRH-III(GFLG) /testsúly kg konjugátumot kétszeri adagolással a tumorbeültetést követő 4. és 7. napon.

A kezelési periódus alatt ebben a kísérletben is ellenőrizték a tumor méretét, valamint a fent leírt képlet alapján meghatározták a tumortérfogatot (49. ábra).



## 6 Összefoglalás

Doktori munkám során a natív GnRH-III molekula tumorelles hatásának fokozása érdekében előállítottam:

- új, hatékonyabb tumorelles hatással rendelkező GnRH-III származékokat. A hatékonyság növelése érdekében
  - az önmagában is tumorelles hatással bíró természetes GnRH analógokból szimmetrikus (2 vegyület) és aszimmetrikus (6 vegyület) dimer származékokat állítottam elő,
  - valamint citosztatikum GnRH-III molekulához való kapcsolását észter-, hidrazon-, oxim- és amidkötés felhasználásával valósítottam meg.
- A szintetikus előállított és analitikailag jellemzett (retenciós idő, molekulatömeg) dimerszármazékok és hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok *in vitro* hatásosságát teszteltem különböző biológiai paraméterek meghatározásával eltérő biológiai rendszereken.
  - Mivel a GnRH származékok jelentős endokrin hatással rendelkeznek, LH-szekrécióna való hatásukat vizsgáltuk meg patkány hipofízis sejtek felhasználásával. A szimmetrikus dimerek nem rendelkeztek jelentős endokrin hatással (gyenge agonisták). Ezzel ellentétben az aszimmetrikus dimerek szignifikáns LH-szekréción készségeel bírnak. Ez az endokrin hatás bizonyos esetben meghaladta a szuperagonista [*D*-Lys<sup>6</sup>]GnRH-I LH-felszabadító készségeel is. Ezért ezeket szuperagonista származékoknak tekintjük.
  - A dimerek antiproliferatív hatása sejtfüggőnek bizonyult. A szimmetrikus dimerek jelentős antiproliferatív hatással rendelkeztek MCF-7 és HT-29 sejteken, míg az aszimmetrikus dimerek T-47D sejtvonalon mutattak szignifikáns sejtosztódást gátló hatást.
  - Apoptotikus képességük alapján a dimerek közül az aszimmetrikus struktúrával rendelkezők apoptózis kiváltására képesek, míg a szimmetrikus dimer formák nem indítanak be korai apoptotikus folyamatokat.
  - Sejtbejutási vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy mind a dimer, mind pedig a hatóanyagot tartalmazó konjugátum képes a vizsgált sejtekbe (MCF-7, HT-29, C26) bejutni.

- Továbbá a hatóanyagot tartalmazó konjugátumban a citosztatikum megtartja a DNS-hez való kötődési képességet, így a sejtbe bejutva a hatóanyag interkalálódik a DNS-be, ezáltal képes sejtosztódást gátló hatás kifejtésére.
- A hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok citosztatikus hatását határoztam meg. A vizsgált sejteken az észterkötésű konjugátumok bizonyultak a leghatásosabbnak, ezt követte a hidrazon-, oxim- és végül az amidkötést tartalmazó konjugátumok citosztatikus hatása.
- A GnRH-III szimmetrikus dimer származékok jelentős (40%) *in vivo* tumorelles hatással rendelkeznek. A szimmetrikus dimerek *in vitro* eltérő antiproliferatív hatással rendelkeztek, ez a különbség nem volt megfigyelhető *in vivo* körülmények között.
- A hatóanyagot tartalmazó konjugátuma *in vivo* nem volt toxikus, a maximálisan tolerált dózisa (MTD) 30 mg Dau tartalom/ testsúly kg fölött van. Az alkalmazott dózisokban a szabad hatóanyag és a konjugátum tumorelles hatása közel azonos volt, viszont a túlélési idő a szabad hatóanyag esetében lényegesen alacsonyabb volt, mint a konjugátum esetében.

Az eredmények alapján elmondható, hogy sikerült fokoznom a natív GnRH-III tumorelles hatását mind a dimerizációval, mind pedig a hatóanyag hozzákapcsolásával. Mindkét esetben fokozottabb tumorelles hatást kaptam. Az endokrin hatás figyelembevételével a szimmetrikus dimerek alapjául szolgálhatnak hatóanyagok hordozó molekulájának, míg az aszimmetrikus dimerek jelentős endokrin hatásuk révén önmagukban is alkalmazhatók emlőtumorok kezelésére.

## 7 Irodalomjegyzék

1. Koizumi, K., Current surgical strategies for lung cancer with a focus on open thoracotomy and video-assisted thoracic surgery. *J Nippon Med Sch* **2006**, 73 (3), 116-21.
2. Senkowski, C., Minimally invasive esophagectomy: early experience and outcomes. *Am Surg* **2006**, 72 (8), 677-83; discussion 683.
3. Huscher, C.; Mingoli, A.; Sgarzini, G.; Sansonetti, A.; Di Paola, M.; Recher, A.; Ponzano, C., Laparoscopic versus open subtotal gastrectomy for distal gastric cancer: five-year results of a randomized prospective trial. *Ann Surg* **2005**, 241 (2), 232-7.
4. Seki, S.; Sakaguchi, H.; Iwai, S.; Kadoya, H.; Kabayashi, S.; Kitada, T.; Fujii, H.; Tanaka, T., Five-year survival of patients with hepatocellular carcinoma treated with laparoscopic microwave coagulation therapy. *Endoscopy* **2005**, 37 (12), 1220-5.
5. Novitsky, Y.; Kercher, K.; Harrell, A.; Heniford, B., Laparoscopic expertise increases hospital volume of adrenal surgery. *Surg Innov* **2006**, 13 (2), 109-14.
6. Kapoor, A.; Nguan, C.; Al-Shaiji, T.; Hussain, A.; Fazio, L.; Al Omar, M.; Luke, P., Laparoscopic management of advanced renal cell carcinoma with level I renal vein thrombus. *Urology* **2006**, 68 (3), 514-7.
7. Speight, J.; Roach, M., New techniques and management options for localized prostate cancer. *Rev Urol* **2006**, 8 Suppl 2, S22-9.
8. Fernández-Cruz, L.; Pardo, F.; Cugat, E.; Artigas, V.; Olsina, J.; Rotellar, F.; Carrillo, A.; Díaz, H.; Hernández, J.; Targarona, E.; Miras, M.; Morales-Conde, S.; Morales-Méndez, S.; Pereira, F.; Calafell, J., [Analysis of the Spanish National Registry of Laparoscopic Pancreatic Surgery]. *Cir Esp* **2006**, 79 (5), 293-8.
9. Liang, J.; Huang, K.; Lai, H.; Lee, P.; Jeng, Y., Oncologic results of laparoscopic versus conventional open surgery for stage II or III left-sided colon cancers: a randomized controlled trial. *Ann Surg Oncol* **2007**, 14 (1), 109-17.
10. Chabner, B., Collins J., *Cancer Chemotherapy. Principles and Practice*. J B Lippincott: Philadelphia, **1990**.
11. Frei E III, Antman KH., Combination chemotherapy, dose and schedule. In: Holland JF, Frei E III, Bast RC et al (eds) *Cancer Medicine*, 4th ed. Williams & Wilkins: Philadelphia **1997**, 817-837.
12. Hammond GD., Principles of pediatric oncology. In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR (eds) *Cancer medicine*, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore **1997**, 2885–2890.
13. Nagy, A.; Schally, A., Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers. *Biol Reprod* **2005**, 73 (5), 851-9.

14. Rahimipour, S.; Ben-Aroya, N.; Ziv, K.; Chen, A.; Fridkin, M.; Koch, Y., Receptor-mediated targeting of a photosensitizer by its conjugation to gonadotropin-releasing hormone analogues. *J Med Chem* **2003**, *46* (19), 3965-74.
15. Minko, T.; Dharap, S.; Pakunlu, R.; Wang, Y., Molecular targeting of drug delivery systems to cancer. *Curr Drug Targets* **2004**, *5* (4), 389-406.
16. Low, P.; Antony, A., Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56* (8), 1055-8.
17. David, A.; Kopecková, P.; Minko, T.; Rubinstein, A.; Kopecek, J., Design of a multivalent galactoside ligand for selective targeting of HPMa copolymer-doxorubicin conjugates to human colon cancer cells. *Eur J Cancer* **2004**, *40* (1), 148-57.
18. Yamazaki, N.; Kojima, S.; Bovin, N.; André, S.; Gabius, S.; Gabius, H., Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2000**, *43* (2-3), 225-44.
19. Wirth, M.; Gerhardt, K.; Wurm, C.; Gabor, F., Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J Control Release* **2002**, *79* (1-3), 183-91.
20. Wróblewski, S.; Ríhová, B.; Rossmann, P.; Hudcovicz, T.; Reháková, Z.; Kopecková, P.; Kopecek, J., The influence of a colonic microbiota on HPMa copolymer lectin conjugates binding in rodent intestine. *J Drug Target* **2001**, *9* (2), 85-94.
21. Cho, N.; Chueh, P.; Kim, C.; Caldwell, S.; Morré, D.; Morré, D., Monoclonal antibody to a cancer-specific and drug-responsive hydroquinone (NADH) oxidase from the sera of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **2002**, *51* (3), 121-9.
22. Trail, P.; King, H.; Dubowchik, G., Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* **2003**, *52* (5), 328-37.
23. Mao, W.; Luis, E.; Ross, S.; Silva, J.; Tan, C.; Crowley, C.; Chui, C.; Franz, G.; Senter, P.; Koeppen, H.; Polakis, P., EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Res* **2004**, *64* (3), 781-8.
24. Bédécarrats, G.; Kaiser, U., Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology* **2003**, *144* (5), 1802-11.
25. Kang, S.; Cheng, K.; Ngan, E.; Chow, B.; Choi, K.; Leung, P., Differential expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in pituitary and ovarian cells. *Mol Cell Endocrinol* **2000**, *162* (1-2), 157-66.
26. Imai, A.; Tamaya, T., GnRH receptor and apoptotic signaling. *Vitam Horm* **2000**, *59*, 1-33.
27. Rathbone, M.; Hadgraft, J.; Roberts, M., *Modified-Release Drug Delivery Technology*. Marcel Dekker: New York, **2003**.
28. Shibata, H.; Nakagawa, S.; Tsutsumi, Y., Optimization of protein therapies by polymer-conjugation as an effective DDS. *Molecules* **2005**, *10* (1), 162-80.
29. Wang, S.; Cui, W.; Bei, J., Bulk and surface modifications of polylactide. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *381* (3), 547-56.
30. Dharap, S.; Wang, Y.; Chandna, P.; Khandare, J.; Qiu, B.; Gunaseelan, S.; Sinko, P.;

- Stein, S.; Farmanfarmanian, A.; Minko, T., Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (36), 12962-7.
31. Hacker, M.; Klouda, L.; Ma, B.; Kretlow, J.; Mikos, A., Synthesis and characterization of injectable, thermally and chemically gelable, amphiphilic poly(N-isopropylacrylamide)-based macromers. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (6), 1558-70.
  32. Cascone, M.; Lazzeri, L.; Carmignani, C.; Zhu, Z., Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J Mater Sci Mater Med* **2002**, *13* (5), 523-6.
  33. Sampedro, F.; Partika, J.; Santalo, P.; Molins-Pujol, A.; Bonal, J.; Perez-Soler, R., Liposomes as carriers of different new lipophilic antitumour drugs: a preliminary report. *J Microencapsul* **1994**, *11* (3), 309-18.
  34. Duncan, R.; Vicent, M.; Greco, F.; Nicholson, R., Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocr Relat Cancer* **2005**, *12 Suppl 1*, S189-99.
  35. David, A.; Kopecková, P.; Kopecek, J.; Rubinstein, A., The role of galactose, lactose, and galactose valency in the biorecognition of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by human colon adenocarcinoma cells. *Pharm Res* **2002**, *19* (8), 1114-22.
  36. David, A.; Kopecková, P.; Rubinstein, A.; Kopecek, J., Enhanced biorecognition and internalization of HPMA copolymers containing multiple or multivalent carbohydrate side-chains by human hepatocarcinoma cells. *Bioconjug Chem* **2001**, *12* (6), 890-9.
  37. O'Hare, K.; Duncan, R.; Strohm, J.; Ulbrich, K.; Kopeckova, P., Polymeric drug-carriers containing doxorubicin and melanocyte-stimulating hormone: in vitro and in vivo evaluation against murine melanoma. *J Drug Target* **1993**, *1* (3), 217-29.
  38. Hudecz, F.; Szekerke, M., Synthesis of new branched polypeptides with poly(lysine) backbone. *Collect. Czech. Chem. Commun* **1984**, *50*, 103-113.
  39. Mezo, G.; Kajtar, J.; Hudecz, F.; Szekerke, M., Carrier design: Conformational studies of amino acid (X) and oligopeptide (X-DL-Ala<sub>m</sub>) substituted poly(L-lysine). *Biopolymers* **1993**, *33*, 873-885.
  40. Hudecz, F.; Price, M., Monoclonal antibody binding to peptide epitopes conjugated to synthetic branched chain polypeptide carriers. Influence of the carrier upon antibody recognition. *J Immunol Methods* **1992**, *147* (2), 201-10.
  41. Wilkinson, K.; Vordermeier, H.; Wilkinson, R.; Ivanyi, J.; Hudecz, F., Synthesis and in vitro T-cell immunogenicity of conjugates with dual specificity: attachment of epitope peptides of 16 and 38 kDa proteins from Mycobacterium tuberculosis to branched polypeptide. *Bioconjug Chem* **1998**, *9* (5), 539-47.
  42. Najjar, V.; Nishioka, K., "Tuftsin": a natural phagocytosis stimulating peptide. *Nature* **1970**, *228* (5272), 672-3.
  43. Najjar, V., Biological and biochemical characteristics of the tetrapeptide tuftsin, Thr-Lys-Pro-Arg. *Adv Exp Med Biol* **1979**, *121* (A), 131-47.
  44. Mezö, G.; Kalászi, A.; Reményi, J.; Majer, Z.; Hilbert, A.; Láng, O.; Köhidai, L.; Barna, K.; Gaál, D.; Hudecz, F., Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers* **2004**, *73* (6), 645-56.

45. Bai, K.; Láng, O.; Orbán, E.; Szabó, R.; Köhidai, L.; Hudecz, F.; Mezö, G., Design, synthesis, and in vitro activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate. *Bioconjug Chem* **2008**, *19* (11), 2260-9.
46. Pastan, I.; FitzGerald, D., Recombinant toxins for cancer treatment. *Science* **1991**, *254* (5035), 1173-7.
47. FitzGerald, D.; Pastan, I., Targeted toxin therapy for the treatment of cancer. *J Natl Cancer Inst* **1989**, *81* (19), 1455-63.
48. Singh, V.; Sairam, M.; Bhargavi, G.; Akhras, R., Hormonotoxins. Preparation and characterization of ovine luteinizing hormone-gelolin conjugate. *J Biol Chem* **1989**, *264* (6), 3089-95.
49. Baldwin, R., Monoclonal antibody targeting of anti-cancer agents: Mühlbock memorial lecture. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1985**, *21* (11), 1281-5.
50. Hertler, A.; Frankel, A., Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *J Clin Oncol* **1989**, *7* (12), 1932-42.
51. Yeh, M.; Roffler, S.; Yu, M., Doxorubicin: monoclonal antibody conjugate for therapy of human cervical carcinoma. *Int J Cancer* **1992**, *51* (2), 274-82.
52. Schally, A. V., Nagy, A., Szepeshazi, K., Pinski, J., Halmos, G., Armatis, P., Miyazaki, M., Comaru-Schally, A-M, Yano, T., Emons G., LHRH analogs with cytotoxic radicals. In: Filicori M, Flamigni C. (eds.), *Treatment with Gn-RH analogs: Controversies and perspectives*. Carnforth, U.K.: Parthenon Publishing **1996**, 33–44.
53. Szepeshazi, K.; Schally, A.; Halmos, G., LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol* **2007**, *30* (6), 1485-92.
54. Gilladoga, A.; Manuel, C.; Tan, C.; Wollner, N.; Sternberg, S.; Murphy, M., The cardiotoxicity of adriamycin and daunomycin in children. *Cancer* **1976**, *37* (2 Suppl), 1070-8.
55. Minotti, G.; Cavaliere, A.; Mordente, A.; Rossi, M.; Schiavello, R.; Zamparelli, R.; Possati, G., Secondary alcohol metabolites mediate iron delocalization in cytosolic fractions of myocardial biopsies exposed to anticancer anthracyclines. Novel linkage between anthracycline metabolism and iron-induced cardiotoxicity. *J Clin Invest* **1995**, *95* (4), 1595-605.
56. Jeney, A., *Onkofarmakológia*. Medicina Kiadó: Budapest, **2005**.
57. Schally, A.; Arimura, A.; Baba, Y., Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1971**, *43*, 393–399.
58. Matsuo, H., Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1971**, *43*, 1334–1339.
59. Baba, Y., Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1971**, *44*, 459–463.
60. Millar, R., GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* **2005**, *88* (1-2), 5-28.
61. Powell, J., Two newforms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Neurobiology* **1996**, *93*, 10461–10464.
62. Adams, B.; Tello, J.; Erchegeyi, J.; Warby, C.; Hong, D.; Akinsanya, K.; Mackie, G.;

- Vale, W.; Rivier, J.; Sherwood, N., Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology* **2003**, *144* (5), 1907-19.
63. White, R.; Eisen, J.; Kasten, T.; Fernald, R., Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (1), 305-9.
  64. Fink G: Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press **1988**, 1349-1377.
  65. Seeburg, P.; Mason, A.; Stewart, T.; Nikolics, K., The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res* **1987**, *43*, 69-98.
  66. Millar, R.; Lowe, S.; Conklin, D.; Pawson, A.; Maudsley, S.; Troskie, B.; Ott, T.; Millar, M.; Lincoln, G.; Sellar, R.; Faurholm, B.; Scobie, G.; Kuestner, R.; Terasawa, E.; Katz, A., A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (17), 9636-41.
  67. Neill, J.; Duck, L.; Sellers, J.; Musgrove, L., A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *282* (4), 1012-8.
  68. King, J., Millar, R., Coordinated evolution of GnRHs and their receptors. In: I.S. Parhar and Y. Sakuma, Editors, *GnRH Neurons, Gene to Behavior*, Brain Shuppan, Tokyo **1997**, 51-77.
  69. Sealfon, S.; Weinstein, H.; Millar, R., Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* **1997**, *18* (2), 180-205.
  70. Millar, R., Gonadotropin releasing hormones and their receptors. In *Molecular Biology In Fauser, B. C. J. M. Ed: Clinical Reproductive Medicine*,. Parthenon **2002**, 199-224.
  71. Urbanski, H.; White, R.; Fernald, R.; Kohama, S.; Garyfallou, V.; Densmore, V., Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology* **1999**, *140* (4), 1945-8.
  72. Latimer, V.; Kohama, S.; Garyfallou, V.; Urbanski, H., A developmental increase in the expression of messenger ribonucleic acid encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the rhesus macaque hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, *86* (1), 324-9.
  73. Lescheid, D.; Terasawa, E.; Abler, L.; Urbanski, H.; Warby, C.; Millar, R.; Sherwood, N., A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* **1997**, *138* (12), 5618-29.
  74. Cheon, K.; Lee, H.; Parhar, I.; Kang, I., Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **2001**, *7* (5), 447-52.
  75. Choi, K.; Auersperg, N.; Leung, P., Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, *86* (10), 5075-8.
  76. Kang, S.; Tai, C.; Nathwani, P.; Leung, P., Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* **2001**, *142* (1), 182-92.
  77. Chen, A.; Kaganovsky, E.; Rahimipour, S.; Ben-Aroya, N.; Okon, E.; Koch, Y., Two

- forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer: a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2. *Cancer Res* **2002**, 62 (4), 1036-44.
78. Sherwood, N.; Lovejoy, D.; Coe, I., Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev* **1993**, 14 (2), 241-54.
  79. Wang, L.; Bogerd, J.; Choi, H.; Seong, J.; Soh, J.; Chun, S.; Blumenröhr, M.; Troskie, B.; Millar, R.; Yu, W.; McCann, S.; Kwon, H., Three distinct types of GnRH receptor characterized in the bullfrog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98 (1), 361-6.
  80. Karten, M.; Rivier, J., Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* **1986**, 7 (1), 44-66.
  81. Millar, R.; Flanagan, C.; Milton, R.; King, J., Chimeric analogues of vertebrate gonadotropin-releasing hormones comprising substitutions of the variant amino acids in positions 5, 7, and 8. Characterization of requirements for receptor binding and gonadotropin release in mammalian and avian pituitary gonadotropes. *J Biol Chem* **1989**, 264 (35), 21007-13.
  82. Millar RP, Troskie B, Sun YM., Plasticity in the structural and functional evolution of GnRH: a peptide for all seasons, *Proc. 13th Int. Conf. Comp. Endocr.*, Yokohama, Japan **1997**, 15–27.
  83. Illing, N.; Troskie, B.; Nahorniak, C.; Hapgood, J.; Peter, R.; Millar, R., Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96 (5), 2526-31.
  84. Millar, R.; King, J., Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone. *Int Rev Cytol* **1987**, 106, 149-82.
  85. King, J.; Millar, R., Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol* **1995**, 15 (1), 5-23.
  86. Flanagan, C.; Becker, I.; Davidson, J.; Wakefield, I.; Zhou, W.; Sealfon, S.; Millar, R., Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* **1994**, 269 (36), 22636-41.
  87. Schally, A.; Bajusz, S.; Redding, T.; Zalutnai, A.; Comaru-Schally, A., Analogs of LH-RH: the present and the future. Gn-RH Analogues in B. H. Vickery and B. Lunenfeld (ed.) *Cancer and Human Reproduction*. Basic Aspects. London: Kluwer Academic Publishers **1989**, 1, 5-31.
  88. Dutta, A., Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonists. *Drugs Future* **1988**, 13, 761-787.
  89. Bajusz, S.; Csernus, V.; Janaky, T.; Bokser, L.; Fekete, M.; Schally, A., New antagonists of LHRH. II. Inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues. *Int J Pept Protein Res* **1988**, 32 (6), 425-35.
  90. Bajusz, S.; Kovacs, M.; Gazdag, M.; Bokser, L.; Karashima, T.; Csernus, V.; Janaky, T.; Guoth, J.; Schally, A., Highly potent antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85 (5), 1637-41.



91. Schally, A.; Srkalovic, G.; Szende, B.; Redding, T.; Janaky, T.; Juhasz, A.; Korkut, E.; Cai, R.; Szepeshazi, K.; Radulovic, S., Antitumor effects of analogs of LH-RH and somatostatin: experimental and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990**, *37* (6), 1061-7.
92. Pfleger, K.; Bogerd, J.; Millar, R., Conformational constraint of mammalian, chicken, and salmon GnRHs, but not GnRH II, enhances binding at mammalian and nonmammalian receptors: evidence for preconfiguration of GnRH II. *Mol Endocrinol* **2002**, *16* (9), 2155-62.
93. Sun, Y.; Flanagan, C.; Illing, N.; Ott, T.; Sellar, R.; Fromme, B.; Hapgood, J.; Sharp, P.; Sealfon, S.; Millar, R., A chicken gonadotropin-releasing hormone receptor that confers agonist activity to mammalian antagonists. Identification of D-Lys(6) in the ligand and extracellular loop two of the receptor as determinants. *J Biol Chem* **2001**, *276* (11), 7754-61.
94. Conn, P.; Huckle, W.; Andrews, W.; McArdle, C., The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Prog Horm Res* **1987**, *43*, 29-68.
95. Schally, A.; Comaru-Schally, A.; Nagy, A.; Kovacs, M.; Szepeshazi, K.; Plonowski, A.; Varga, J.; Halmos, G., Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* **2001**, *22* (4), 248-91.
96. Ji, T.; Grossmann, M.; Ji, I., G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **1998**, *273* (28), 17299-302.
97. Wess, J., G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **1997**, *11* (5), 346-54.
98. Neill, J.; Musgrove, L.; Duck, L., Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab* **2004**, *15* (8), 383-92.
99. Sedgley, K.; Finch, A.; Caunt, C.; McArdle, C., Intracellular gonadotropin-releasing hormone receptors in breast cancer and gonadotrope lineage cells. *J Endocrinol* **2006**, *191* (3), 625-36.
100. Neill, J., GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* **2002**, *143* (3), 737-43.
101. Tensen, C.; Okuzawa, K.; Blumenröhr, M.; Rebers, F.; Leurs, R.; Bogerd, J.; Schulz, R.; Goos, H., Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur J Biochem* **1997**, *243* (1-2), 134-40.
102. Gründker, C.; Schlotawa, L.; Viereck, V.; Eicke, N.; Horst, A.; Kairies, B.; Emons, G., Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* **2004**, *151* (1), 141-9.
103. Völker, P.; Gründker, C.; Schmidt, O.; Schulz, K.; Emons, G., Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol* **2002**, *186* (2), 171-9.
104. Kakar, S.; Grizzle, W.; Neill, J., The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* **1994**, *106* (1-2), 145-9.

105. Gründker, C.; Günthert, A.; Westphalen, S.; Emons, G., Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* **2002**, *146* (1), 1-14.
106. Schally, A.; Comaru-Schally, A., In *Cancer Medicine*, eds. Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Jr., Gansler, T. S., Holland, J. F. & Frei, E., III, Dekker, New York, 6th. Ed., **2003**, 911-926.
107. Reissmann, T.; Schally, A.; Bouchard, P.; Riethmiiller, H.; Engel, J., The LHRH antagonist cetrorelix: a review. *Hum Reprod Update* **2000**, *6* (4), 322-31.
108. Schally, A.; Nagy, A., Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* **2004**, *15* (7), 300-10.
109. Reubi, J., Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* **2003**, *24* (4), 389-427.
110. Schally, A.; Nagy, A., New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. *Life Sci* **2003**, *72* (21), 2305-20.
111. Millar, R.; Lu, Z.; Pawson, A.; Flanagan, C.; Morgan, K.; Maudsley, S., Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* **2004**, *25* (2), 235-75.
112. Ben-Yehudah, A.; Lorberboum-Galski, H., Targeted cancer therapy with gonadotropin-releasing hormone chimeric proteins. *Expert Rev Anticancer Ther* **2004**, *4* (1), 151-61.
113. Miller, W.; Scott, W.; Morris, R.; Fraser, H.; Sharpe, R., Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* **1985**, *313* (5999), 231-3.
114. Eidne, K.; Flanagan, C.; Millar, R., Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma. *Science* **1985**, *229* (4717), 989-91.
115. Fekete, M.; Wittliff, J.; Schally, A., Characteristics and distribution of receptors for [D-Trp<sup>6</sup>]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal* **1989**, *3* (3), 137-47.
116. Baumann, K.; Kiesel, L.; Kaufmann, M.; Bastert, G.; Runnebaum, B., Characterization of binding sites for a GnRH-agonist (buserelin) in human breast cancer biopsies and their distribution in relation to tumor parameters. *Breast Cancer Res Treat* **1993**, *25* (1), 37-46.
117. Qayum, A.; Gullick, W.; Clayton, R.; Sikora, K.; Waxman, J., The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumour receptors. *Br J Cancer* **1990**, *62* (1), 96-9.
118. Limonta, P.; Dondi, D.; Moretti, R.; Fermo, D.; Garattini, E.; Motta, M., Expression of luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* **1993**, *76* (3), 797-800.
119. Straub, B.; Müller, M.; Krause, H.; Schrader, M.; Goessl, C.; Heicappell, R.; Miller, K., Increased incidence of luteinizing hormone-releasing hormone receptor gene messenger RNA expression in hormone-refractory human prostate cancers. *Clin Cancer Res* **2001**, *7* (8), 2340-3.
120. Mangia, A.; Tommasi, S.; Reshkin, S.; Simone, G.; Stea, B.; Schittulli, F.; Paradiso,

- A., Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep* **2002**, *9* (5), 1127-32.
121. Kottler, M.; Starzec, A.; Carre, M.; Lagarde, J.; Martin, A.; Counis, R., The genes for gonadotropin-releasing hormone and its receptor are expressed in human breast with fibrocystic disease and cancer. *Int J Cancer* **1997**, *71* (4), 595-9.
  122. Limonta, P.; Moretti, R.; Marelli, M.; Dondi, D.; Parenti, M.; Motta, M., The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* **1999**, *140* (11), 5250-6.
  123. Krsmanovic, L.; Mores, N.; Navarro, C.; Arora, K.; Catt, K., An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (5), 2969-74.
  124. Tieva A; Stattin, P.; Wikström, P.; Bergh, A.; Damber, J., Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the human prostate. *Prostate* **2001**, *47* (4), 276-84.
  125. Gründker, C.; Völker, P.; Griesinger, F.; Ramaswamy, A.; Nagy, A.; Schally, A.; Emons, G., Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol* **2002**, *187* (3), 528-37.
  126. Neill, J., Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor subtypes. *Arch Physiol Biochem* **2002**, *110* (1-2), 129-36.
  127. Chou, C.; MacCalman, C.; Leung, P., Differential effects of gonadotropin-releasing hormone I and II on the urokinase-type plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor system in human decidual stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, *88* (8), 3806-15.
  128. Chou, C.; Zhu, H.; MacCalman, C.; Leung, P., Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, *88* (10), 4781-90.
  129. Fister, S.; Günthert, A.; Emons, G.; Gründker, C., Gonadotropin-releasing hormone type II antagonists induce apoptotic cell death in human endometrial and ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **2007**, *67* (4), 1750-6.
  130. Gründker, C.; Völker, P.; Emons, G., Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* **2001**, *142* (6), 2369-80.
  131. Emons, G.; Müller, V.; Ortmann, O.; Grossmann, G.; Trautner, U.; von Stuckrad, B.; Schulz, K.; Schally, A., Luteinizing hormone- releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol* **1996**, *9* (1), 1129-1137.
  132. Gründker, C.; Völker, P.; Schulz, K.; Emons, G., Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin and antagonist cetorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. *Gynecol Oncol* **2000**, *78* (2), 194-202.
  133. Harrison, G.; Wierman, M.; Nett, T.; Glode, L., Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* **2004**, *11* (4), 725-48.

134. Fekete, M.; Bajusz, S.; Groot, K.; Csernus, V.; Schally, A., Comparison of different agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for receptor-binding ability to rat pituitary and human breast cancer membranes. *Endocrinology* **1989**, *124* (2), 946-55.
135. Pollak, M.; Perdue, J.; Margolese, R.; Baer, K.; Richard, M., Presence of somatomedin receptors on primary human breast and colon carcinomas. *Cancer Lett* **1987**, *38* (1-2), 223-30.
136. Fekete, M.; Zalatnai, A.; Comaru-Schally, A.; Schally, A., Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* **1989**, *4* (5), 521-8.
137. Yano, T.; Pinski, J.; Halmos, G.; Szepeshazi, K.; Groot, K.; Schally, A., Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91* (15), 7090-4.
138. Shirahige, Y.; Cook, C.; Pinski, J.; Halmos, G.; Nair, R.; Schally, A., Treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 decreases levels of epidermal growth factor receptor and its mRNA in OV-1063 human epithelial ovarian cancer Xenografts in nude mice. *Int. J. Oncol* **1994**, *5*, 1031-1035.
139. Néri, C.; Berthois, Y.; Schatz, B.; Drieu, K.; Martin, PM, Compared effects of GnRH analogs and 4-hydroxytamoxifen on growth and steroid receptors in antiestrogen sensitive and resistant MCF-7 breast cancer cell sublines. *Breast Cancer Research and Treatment* **1990**, *15*(2), 85-93.
140. Scott, W.; Mullen, P.; Miller, W., Factors influencing the response of MCF-7 cells to an agonist of luteinising hormone-releasing hormone. *Eur J Cancer* **1991**, *27* (11), 1458-61.
141. Kim, K.; Choi, K.; Auersperg, N.; Leung, P., Mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and -II-induced cell growth inhibition in ovarian cancer cells: role of the GnRH-I receptor and protein kinase C pathway. *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13* (1), 211-20.
142. Gründker, C.; Emons, G., Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **2003**, *1*, 65.
143. Limonta, P.; Moretti, R.; Marelli, M.; Motta, M., The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* **2003**, *24* (4), 279-95.
144. Leung, P.; Cheng, C.; Zhu, X., Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* **2003**, *202* (1-2), 145-53.
145. Enomoto, M.; Mori, T.; Park, M., GnRH agonist Buserelin affects colony-forming efficiency of HHUA and Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *289* (5), 1180-7.
146. Gründker, C.; Günthert, A.; Millar, R.; Emons, G., Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, *87* (3), 1427-30.
147. Emons, G.; Gründker, C.; Günthert, A.; Westphalen, S.; Kavanagh, J.; Verschraegen, C., GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* **2003**, *10* (2), 291-9.

148. Kang, S.; Choi, K.; Yang, H.; Leung, P., Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* **2003**, *10* (2), 169-77.
149. Tang, X.; Yano, T.; Osuga, Y.; Matsumi, H.; Yano, N.; Xu, J.; Wada, O.; Koga, K.; Kugu, K.; Tsutsumi, O.; Schally, A.; Taketani, Y., Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**, *87* (8), 3721-7.
150. Kim, K.; Choi, K.; Park, S.; Auersperg, N.; Leung, P., Extracellular signal-regulated protein kinase, but not c-Jun N-terminal kinase, is activated by type II gonadotropin-releasing hormone involved in the inhibition of ovarian cancer cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, *90* (3), 1670-7.
151. Eicke, N.; Günthert, A.; Emons, G.; Gründker, C., GnRH-II agonist [D-Lys<sup>6</sup>]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Oncol* **2006**, *29* (5), 1223-9.
152. von Alten, J.; Fister, S.; Schulz, H.; Viereck, V.; Frosch, K.; Emons, G.; Gründker, C., GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **2006**, *100* (1), 13-21.
153. Isaacs, J.; Coffey, D., Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer Res* **1981**, *41* (12 Pt 1), 5070-5.
154. Isaacs, J., The timing of androgen ablation therapy and/or chemotherapy in the treatment of prostatic cancer. *Prostate* **1984**, *5* (1), 1-17.
155. Ling, N.; Rivier, J.; Monahan, M.; Vale, W., Analogues of luteinizing hormone releasing factor modified at positions 2, 6, and 10. *J Med Chem* **1976**, *19* (7), 937-41.
156. Bajusz, S.; Janaky, T.; Csernus, V.; Bokser, L.; Fekete, M.; Srkalovic, G.; Redding, T.; Schally, A., Highly potent analogues of luteinizing hormone-releasing hormone containing D-phenylalanine nitrogen mustard in position 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86* (16), 6318-22.
157. Coy, D.; Vilchez-Martinez, J.; Coy, E.; Schally, A., Analogs of luteinizing hormone-releasing hormone with increased biological activity produced by D-amino acid substitutions in position 6. *J Med Chem* **1976**, *19* (3), 423-5.
158. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J.; Mansour, V., Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **1969**, *222* (5191), 385-6.
159. Elo, H.; Lumme, P., Antitumor activity of trans-bis(salicylaldoximate)copper(II): a novel antiproliferative metal complex. *Cancer Treat Rep* **1985**, *69* (9), 1021-2.
160. Bajusz, S.; Janaky, T.; Csernus, V.; Bokser, L.; Fekete, M.; Srkalovic, G.; Redding, T.; Schally, A., Highly potent metallopeptide analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86* (16), 6313-7.
161. Janáky, T.; Juhász, A.; Bajusz, S.; Csernus, V.; Srkalovic, G.; Bokser, L.; Milovanovic, S.; Redding, T.; Rékási, Z.; Nagy, A., Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89* (3), 972-6.
162. Nagy, A.; Armatis, P.; Schally, A., High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: structure-activity

- relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93 (6), 2464-9.
163. Nagy, A.; Schally, A.; Armatis, P.; Szepeshazi, K.; Halmos, G.; Kovacs, M.; Zarandi, M.; Groot, K.; Miyazaki, M.; Jungwirth, A.; Horvath, J., Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93 (14), 7269-73.
  164. Engel, J.; Schally, A.; Dietl, J.; Rieger, L.; Hönig, A., Targeted therapy of breast and gynecological cancers with cytotoxic analogues of peptide hormones. *Mol Pharm* **2007**, 4 (5), 652-8.
  165. Keller, G.; Schally, A.; Gaiser, T.; Nagy, A.; Baker, B.; Halmos, G.; Engel, J., Receptors for luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) expressed in human non-Hodgkin's lymphomas can be targeted for therapy with the cytotoxic LHRH analogue AN-207. *Eur J Cancer* **2005**, 41 (14), 2196-202.
  166. Keller, G.; Schally, A.; Gaiser, T.; Nagy, A.; Baker, B.; Westphal, G.; Halmos, G.; Engel, J., Human malignant melanomas express receptors for luteinizing hormone releasing hormone allowing targeted therapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Cancer Res* **2005**, 65 (13), 5857-63.
  167. Tritton, T.; Yee, G., The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* **1982**, 217 (4556), 248-50.
  168. Tritton, T., Cell surface actions of adriamycin. *Pharmacol Ther* 1991, 49 (3), 293-309.
  169. Kaliste-Korhonen, E.; Tuovinen, K.; Hänninen, O., Interspecies differences in enzymes reacting with organophosphates and their inhibition by paraoxon in vitro. *Hum Exp Toxicol* **1996**, 15 (12), 972-8.
  170. Nagy, A.; Plonowski, A.; Schally, A., Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin 14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro: implications for the design of preclinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97 (2), 829-34.
  171. Engel, J.; Keller, G.; Schally, A.; Nagy, A.; Chism, D.; Halmos, G., Effective treatment of experimental human endometrial cancers with targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogues AN-152 and AN-207. *Fertil Steril* **2005**, 83 Suppl 1, 1125-33.
  172. Gaiser, T.; Rüschoff, J.; Schally, A.; Keller, G.; Engel, J., [Receptors for luteinizing hormone releasing hormone expressed on melanoma, renal cell carcinoma and non Hodgkin lymphoma can be used for targeted chemotherapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogues]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **2006**, 90, 186-92.
  173. Szepeshazi, K.; Schally, A.; Nagy, A.; Halmos, G.; Groot, K., Targeted cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) analogs inhibit growth of estrogen independent MXT mouse mammary cancers in vivo by decreasing cell proliferation and inducing apoptosis. *Anticancer Drugs* **1997**, 8 (10), 974-87.
  174. Rivier, J.; Vale, W.; Burgus, R.; Ling, N.; Amoss, M.; Blackwell, R.; Guillemin, R., Synthetic luteinizing hormone-releasing factor analogs. Series of short-chain amide LRF homologs converging to the amino terminus. *J Med Chem* **1973**, 16 (5), 545-9.
  175. Rivier, J.; Amoss, M.; Rivier, C.; Vale, W., Synthetic luteinizing hormone releasing factor. Short chain analogs. *J Med Chem* **1974**, 17 (2), 230-3.

176. Sievertsson, H.; Chang, J.; Bogentoft, C.; Currie, B.; Folkers, K., Synthesis of the luteinizing releasing hormone of the hypothalamus and its hormonal activity. *Biochem Biophys Res Commun* **1971**, *44* (6), 1566-71.
177. Fujino, M.; Lobayashi, S.; Obayashi, M.; Shinagawa, S.; Fukuda, T., Structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH). *Biochem Biophys Res Commun* **1972**, *49* (3), 863-9.
178. Sandow, J.; König, W., Studies with fragments of a highly active analogue of luteinizing hormone releasing hormone. *J Endocrinol* **1979**, *81* (2), 175-82.
179. Haviv, F.; Palabrica, C.; Bush, E.; Diaz, G.; Johnson, E.; Love, S.; Greer, J., Active reduced-size hexapeptide analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Med Chem* **1989**, *32* (10), 2340-4.
180. Janáky, T.; Juhász, A.; Rékási, Z.; Serfözö, P.; Pinski, J.; Bokser, L.; Srkalovic, G.; Milovanovic, S.; Redding, T.; Halmos, G., Short-chain analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic moieties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89* (21), 10203-7.
181. Harris, N.; Dutlow, C.; Eidne, K.; Dong, K.; Roberts, J.; Millar, R., Gonadotropin-releasing hormone gene expression in MDA-MB-231 and ZR-75-1 breast carcinoma cell lines. *Cancer Res* **1991**, *51* (10), 2577-81.
182. Sower, S.; Chiang, Y.; Lovas, S.; Conlon, J., Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* **1993**, *132* (3), 1125-31.
183. Kovács, M.; Koppán, M.; Mezö, I.; Teplán, I.; Flerkó, B., Antioviulatory doses of antagonists of LH-RH inhibit LH and progesterone but not FSH and estradiol release. *J Neuroendocrinol* **1993**, *5* (6), 603-8.
184. Lovas, S.; Pályi, I.; Vincze, B.; Horváth, J.; Kovács, M.; Mezö, I.; Tóth, G.; Teplán, I.; Murphy, R., Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III. *J Pept Res* **1998**, *52* (5), 384-9.
185. Kovács, M.; Vincze, B.; Horváth, J.; Seprödi, J., Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs. *Peptides* **2007**, *28* (4), 821-9.
186. Pályi, I.; Vincze, B.; Lovas, S.; Mezö, I.; Pató, J.; Kálnay, A.; Turi, G.; Gaál, D.; Mihalik, R.; Péter, I.; Teplán, I.; Murphy, R., Gonadotropin-releasing hormone analogue conjugates with strong selective antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (5), 2361-6.
187. Mezö, I.; Lovas, S.; Pályi, I.; Vincze, B.; Kálnay, A.; Turi, G.; Vadász, Z.; Seprödi, J.; Idei, M.; Tóth, G.; Gulyás, E.; Otvös, F.; Mák, M.; Horváth, J.; Teplán, I.; Murphy, R., Synthesis of gonadotropin-releasing hormone III analogs. Structure-antitumor activity relationships. *J Med Chem* **1997**, *40* (21), 3353-8.
188. Kálnay, A.; Pályi, I.; Vincze, B.; Mihalik, R.; Mezö, I.; Pató, J.; Seprödi, J.; Lovas, S.; Murphy, R., Influence on antiproliferative activity of structural modification and conjugation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues. *Cell Prolif* **2000**, *33* (5), 275-85.
189. Herédi-Szabó, K.; Lubke, J.; Toth, G.; Murphy, R.; Lovas, S., Importance of the central region of lamprey gonadotropin-releasing hormone III in the inhibition of breast cancer cell growth. *Peptides* **2005**, *26* (3), 419-22.

190. Herédi-Szabó, K.; Murphy, R.; Lovas, S., Is lGnRH-III the most potent GnRH analog containing only natural amino acids that specifically inhibits the growth of human breast cancer cells? *J Pept Sci* **2006**, *12* (11), 714-20.
191. Millar, R., GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab* **2003**, *14* (1), 35-43.
192. Pinski, J.; Schally, A.; Yano, T.; Groot, K.; Srkalovic, G.; Serfozo, P.; Reissmann, T.; Bernd, M.; Deger, W.; Kutscher, B., Evaluation of the in vitro and in vivo activity of the L-, D,L- and D-Cit<sup>6</sup> forms of the LH-RH antagonist Cetrorelix (SB-75). *Int J Pept Protein Res* **1995**, *45* (5), 410-7.
193. Gregory, H.; Taylor, C.; Hopkins, C., Luteinizing hormone release from dissociated pituitary cells by dimerization of occupied LHRH receptors. *Nature* **1982**, *300* (5889), 269-71.
194. Mezo, G.; Czajlik, A.; Manea, M.; Jakab, A.; Farkas, V.; Majer, Z.; Vass, E.; Bodor, A.; Kapuvári, B.; Boldizsár, M.; Vincze, B.; Csuka, O.; Kovács, M.; Przybylski, M.; Perczel, A.; Hudecz, F., Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides* **2007**, *28* (4), 806-20.
195. Mezö, G.; Manea, M.; Jakab, A.; Kapuvári, B.; Bösze, S.; Schlosser, G.; Przybylski, M.; Hudecz, F., Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J Pept Sci* **2004**, *10* (12), 701-13.
196. Merrifield, R., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc* **1963**, *85*, 2149-2154.
197. Barany, G.; Merrifield, R., *The Peptides*, New York: Academic Press **1979**, *2*, 1-284.
198. Carpino, L., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem* **1972**, *37* (22), 3404-3409.
199. Atherton, E., *Practical Approach*. Oxford University Press: **1989**.
200. Hruby, V.; Muscio, F.; Gronginsky, C.; Gitu, P.; Saba, D.; Chan, W., Solid-phase synthesis of (2-isoleucine, 4-leucine) oxytocin and (2-phenylalanine, 4-leucine) oxytocin and some their pharmacological properties. *J Med Chem* **1973**, *16* (6), 624-9.
201. Ivanov, B.; Robey, F., Effective use of free thiols as scavengers for HF cocktails to deprotect bromo- and chloroacetylated synthetic peptides. *Pept Res* **1996**, *9* (6), 305-7.
202. Banóczy, Z.; Tantos, A.; Farkas, A.; Tompa, P.; Friedrich, P.; Hudecz, F., Synthesis of cell-penetrating conjugates of calpain activator peptides. *Bioconjug Chem* **2007**, *18* (1), 130-7.
203. Szabó, I.; Manea, M.; Orbán, E.; Csámpai, A.; Bosze, S.; Szabó, R.; Tejeda, M.; Gaál, D.; Kapuvári, B.; Przybylski, M.; Hudecz, F.; Mezo, G., Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug. *Bioconjug Chem* **2009**, *20* (4), 656-65.
204. Mezo, G.; Manea, M.; Szabí, I.; Vincze, B.; Kovács, M., New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents. *Curr Med Chem* **2008**, *15* (23), 2366-79.
205. Woodley, J., Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1994**, *11* (2-3), 61-95.
206. Langguth, P.; Bohner, V.; Heizmann, J.; Merkle, H.P.; Wolfram, S.; Amidon, G.L. and Yamashita, S., The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery.



- J. Contr. Rel.* **1997**, *46*, 39–57.
207. Walker, G.; Ledger, R.; Tucker, I., Activity of pancreatic endopeptidases towards luteinizing hormone-releasing hormones. *Int J Pharm* **2001**, *216* (1-2), 77-82.
  208. Ledger, R.; Tucker, I.; Walker, G., Quantitative capillary electrophoresis assay for the proteolytic stability of luteinizing hormone-releasing hormones. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, *769* (2), 235-42.
  209. Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T.; Vicente, M., Synthesis, characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences. *J Med Chem* **2008**, *51* (10), 2915-23.
  210. Szöke, B.; Horváth, J.; Halmos, G.; Rékási, Z.; Groot, K.; Nagy, A.; Schally, A., LH-RH analogue carrying a cytotoxic radical is internalized by rat pituitary cells in vitro. *Peptides* **1994**, *15* (2), 359-66.
  211. Suarez-Quian, C.; Wynn, P.; Catt, K., Receptor-mediated endocytosis of GnRH analogs: differential processing of gold-labeled agonist and antagonist derivatives. *J Steroid Biochem* **1986**, *24* (1), 183-92.
  212. Koopman, G.; Reutelingsperger, C.; Kuijten, G.; Keehnen, R.; Pals, S.; van Oers, M., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **1994**, *84* (5), 1415-20.
  213. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **1995**, *184* (1), 39-51.
  214. Hashizume, T.; Kumahara, A.; Fujino, M.; Okada, K., Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* **2002**, *70* (1-2), 13-21.
  215. Kaplan, E.; Meier, P., Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc* **1958**, *53*, 457-481.
  216. Csernus, V., The dispersed cell superfusion system. In *Neuroendocrine research methods*, B., G., Ed. Harwood Academics Publisher: London **1991**, 71-109.
  217. Kovacs, M.; Seprodi, J.; Koppan, M.; Horvath, J.; Vincze, B.; Teplan, I.; Flerko, B., Lamprey gonadotropin hormone-releasing hormone-III has no selective follicle-stimulating hormone-releasing effect in rats. *J Neuroendocrinol* **2002**, *14* (8), 647-55.
  218. Pályi, I.; Vincze, B.; Kálnay, A.; Turi, G.; Mező, I.; Teplán, I.; Seprődi, J.; Pató, J.; Móra, M., Effect of gonadotropin-releasing hormone analogs and their conjugates on gonadotropin-releasing hormone receptor-positive human cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* **1996**, *20* (2), 146-52.
  219. Tomayko, M.; Reynolds, C., Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **1989**, *24* (3), 148-54.
  220. Frgala, T.; Kalous, O.; Proffitt, R.T.; Reynolds, C.P., A fluorescence microplate cytotoxicity assay with a 4-log dynamic range that identifies synergistic drug combinations. *Mol Cancer Ther* **2007**, *6* (3), 886-897.

## Összefoglalás

A GnRH egy kulcsszerepet betöltő molekula az emlősök szaporodásának szabályozásában. Fontos szerepet tulajdonítanak neki a tumoros sejtek működésének szabályozásában is. A GnRH-I egyik agonista származéka a GnRH-III, melyet első ízben a nagy tengeri ingolából (*Petromyzon marinus*) izoláltak. Ez a hormon analóg direkt tumorelleses hatással rendelkezik szignifikáns endokrin hatás nélkül. Így a célzott kemoterápia potenciális molekulájának tekinthetjük.

A natív GnRH-III tumorelleses hatásának fokozása érdekében különböző GnRH-III szimmetrikus és aszimmetrikus dimer származékokat, valamint hatóanyagot tartalmazó konjugátumokat állítottam elő. Az új GnRH-III származékok endokrin, illetve *in vitro* és *in vivo* hatását kívántam tesztelni különböző biológiai rendszereken.

Az endokrin hatás vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a szimmetrikus dimerek nem rendelkeztek endokrin hatással (gyenge agonisták). Ezzel ellentétben az aszimmetrikus dimerek jelentős LH-szekréciós készséggel bírtak.

Sejtbejutási vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy mind a dimer, mind pedig a hatóanyagot tartalmazó konjugátum képes a vizsgált sejtekbe (MCF-7, HT-29, C26) bejutni. Továbbá a hatóanyagot tartalmazó konjugátumban a citosztatikum megtartja a DNS-hez való kötődési képességét, így a sejtbe bejutva a hatóanyag interkalálódik a DNS-be, ezáltal képes a sejtosztódást gátló hatásának kifejtésére.

A hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok citosztatikus hatásának meghatározásakor az észterkötésű konjugátumok bizonyultak a leghatásosabbnak, ezeket követték a hidrazon-, oxim- és végül az amidkötést tartalmazó konjugátumok.

A dimerek antiproliferatív hatása sejtfüggőnek bizonyult. A szimmetrikus dimerek jelentős antiproliferatív hatással rendelkeztek MCF-7 és HT-29 sejteken, míg az aszimmetrikus dimerek T-47D sejtvonalon mutattak szignifikáns sejtosztódást gátló hatást.

A GnRH-III szimmetrikus dimer származékok jelentős (40%) *in vivo* tumorelleses hatással rendelkeznek. A hatóanyagot tartalmazó konjugátuma *in vivo* nem volt toxikus. A szabad hatóanyag és a konjugátum tumorelleses hatása közel azonos volt, viszont a túlélési idő a szabad hatóanyag esetében lényegesen alacsonyabb volt, mint a konjugátum esetében.

Eredményeim alapján elmondható, hogy sikerült fokoznom a GnRH-III tumorelleses hatását mind a dimer származékok, mind pedig a hatóanyagot tartalmazó konjugátumok előállításával.

## Summary

The hypothalamic decapeptide gonadotropin releasing hormone (GnRH or LHRH) is a key hormone in the regulation of mammalian reproduction. It has also an important role in the regulation of function of tumor cells. GnRH-III is a GnRH-I agonist, which was isolated from the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). It has direct antiproliferative effect without significant LH-secretion. Therefore it can be used as a selective antitumor agent.

In order to enhance the antitumor activity of native GnRH-III, different symmetric and asymmetric dimer derivatives and drug conjugates were synthesized. The endocrine activity and in vitro and in vivo properties were determined using different biological assays.

We observed that the symmetric dimers were weak agonists because they could not evoke LH-releasing from the rat pituitary cells. In contrast to symmetric dimers the asymmetric dimer derivatives were superagonists, they had significant endocrine activity.

The results of the cellular uptake studies suggested that both the drug conjugates and the dimer could be taken up by the investigated tumor cells. The drug containing GnRH-III conjugates retained the binding ability of the free drug to the DNA, hence it can intercalate with DNA after the internalization.

In the determination of in vitro cytostatic effect of conjugates we suggest, that the most effective conjugates were those containing ester bond. The hydrazone and oxime bond containing ones followed that the ester bond containing conjugates, and the last ones were the amide bond containing conjugates.

The antiproliferative effect of dimer derivatives were cell type dependent. The symmetric dimers had significant antiproliferative activity on MCF-7 and HT-29 cells. On the other hand, the asymmetric dimers had no effect on these cell lines, but they inhibited notably the cell proliferation of the T-47D cells.

The GnRH-III symmetric dimer derivatives had significant (40%) in vivo antitumor activity. The drug containing GnRH-III conjugate was not toxic in vivo. The free drug and the conjugate had the same inhibitory effect in vivo, but the conjugate increases the lifespan of mice.

On the basis of the results, the antitumor effect of native GnRH-III was successfully increased by both the synthesis of dimer derivatives and the drug containing conjugates.

#### A témában megjelent publikációk:

1. Mező G., Manea M., **Szabó I.**, Vincze B., Kovács M.: New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents (2008) *Current Med. Chem.* 15, 2366-2379. (IF: 4,944)
2. **Szabó I.**, Manea M., Bősze Sz., Szabó R., Orbán E., Gaál D., Przybylski M., Hudecz F., Mező G.: Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential multivalent anticancer drug (2009) *Bioconjugate Chemistry* 20, 656-665. (IF: 4,384)

#### A dolgozathoz közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

1. Mező G., Jakab A., Bai K., Láng O., Szabó I., Schlosser G., Köhidai L., Hudecz F. Synthesis of oligotuftsins-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting. (2006) *J Pept Sci.* 12, 328-36. (IF: 1,801)
2. Szabó I., Schlosser G., Hudecz F., Mező G.: Disulfide bond rearrangement during regioselective oxidation in PhS(O)Ph/CH<sub>3</sub>SiCl<sub>3</sub> mixture for the synthesis of alpha-conotoxin GI. (2007) *Biopolymers* 88, 20-28. (IF: 2,389)

#### Előadáskivonat referált folyóiratban:

1. Mező G., Jakab A., Bai K., Láng O., **Szabó I.**, Schlosser G., Köhidai L., Hudecz F. Synthesis of oligotuftsins-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting. (2006) *J Pept Sci.* 12, 328-36. (IF: 1,801)
2. Mező, G., Jakab, A., **Szabó, I.**, Bősze, S., Szabó, R., Bai, K.B., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze, B., Csuka, O., Hudecz, F.: Drug delivery based on GnRH-III as targeting moiety. (2006) *J. Pept. Sci.* 12, 98. (IF: 1,801)
3. **Szabó, I.**, Bősze, S., Reményi, J., Schlosser, G., Hudecz, F., Mező, G.: Synthesis and biological activity of new GnRH-III derivatives. (2006) *J. Pept. Sci.* 12, 237. (IF: 1,801)
4. **Szabó, I.**, Bősze, Sz., Orbán, E., Vincze, B., Gaál, D., Csuk, O., Hudecz, F., Mező, G. In vitro and in vivo antitumor effect of symmetric GnRH-III derivatives. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnország, 2008. *J. Pept. Sci.* 14S, 117. (IF: 1,768)
5. Manea, M., **Szabó, I.**, Orbán, E., Bősze, Sz., Tejeda, M., Gaál, D., Kapuvári, B., Csámpai, A., Radnai, L., Mező, G. Development of GnRH-III anthracycline conjugates as multifunctional drug delivery systems for targeted chemotherapy. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnország, 2008. *J. Pept. Sci.* 14S, 116. (IF: 1,768)
6. **Szabó I.**, Bősze Sz., Kovács M., Vincze B., Csuka O., Hudecz F., Mező G.: Antiproliferative effect of GnRH-III and GnRH-II peptide derivatives on MCF-7, T47-D and HT-29 cells 2008. *EJC Supplements* 6(9), 69. (IF: 2,709)

## Előadások nemzetközi vagy hazai konferencián

1. Kőhidai L., Bai K., Láng J., Birinyi J., Láng O., **Szabó I.**, Hudecz F., Mező G.: Kemotaktikus drug-targeting (CDT)- Methotrexatot tartalmazó oligotuftszin konjugátumok sejtfiziológiai hatásainak vizsgálata csillós és monocita modelleken. A Peptidkémiai Munkabizottság és a Nukleotidkémiai Munkabizottság együttes tudományos ülése, Balatonszemes, 2005.
7. **Szabó I.** Antitumor hatású molekulákat tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok szintézise. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Budapest, 2005.
8. **Szabó I.**, Bősze Sz., Reményi J., Schlosser G., Hudecz F., Mező G.: Synthesis and cellular uptake studies of GnRH-III derivatives. Kolozsvár, Románia, 2006.
9. **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Schlosser G., Hudecz F., Mező G.: GnRH-III származékainak sejtbejutási vizsgálata. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006.
10. **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Schlosser G., Hudecz F., Mező G.: GnRH-III fluoreszcein származékának sejtbejutásának vizsgálata, A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2006. május
11. Kapuvári B., Vincze B., Boldizsár M., Bősze Sz., **Szabó I.**, Csuka O., Gaál D., Tóth G., Hudecz F., Mező G.: Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone receptor in colon and breast cancer cell lines targeted for therapy with GnRH analogs. EACR 19, Budapest, 2006.
12. **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Schlosser G., Hudecz F., Mező G.: Synthesis and biological activity of new GnRH-III derivatives. 29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland, 2006. szept.
13. Bai K., Bacsa B., **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Orbán E., Hudecz F., Mező G.: Drug delivery systems based on oligotuftsine carrier. 8th German Peptide Symposium, Heidelberg, Németország, 2007.
14. **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Kovács M., Hudecz F., Mező G.: Új GnRH vegyes dimerek szintézise és hatásának tanulmányozása hipofízis preparátumon és MCF-7 emlődaganat sejtvonalon, A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2007. június
15. Lajkó E., Andódy K., **Szabó I.**, Mező G., Kőhidai L.: GnRH analógok kemotaktikus hatásának összehasonlító vizsgálata *Tetrahymena pyriformis* protozoonon és Mono Mac 6 humán monocita sejtvonalon, A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2007. június
16. Mező G., Manea M., Orbán E., Szabó R., **Szabó I.**, Gaál D., Hudecz F., Bősze Sz.: Daunomicint tartalmazó GnRH-III konjugátumok szintézise és vizsgálata, A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2007. június
17. Manea M., **Szabó I.**, Orbán E., Bősze Sz., Szabó R., Gaál D., Przybylski M., Hudecz F., Mező G.: Development of Multifunctional Antitumour Drug Conjugates for Cancer Therapy, 9th International Symposium Solid Phase Synthesis, Norwich, England, 2007.

18. **Szabó I.**, Bősze Sz., Szabó R., Bai K., Kovács M., Vincze B., Boldizsár M., Kapuvári B., Csuka O., Hudecz F., Mező G.: Antiproliferative Effect of GnRH-III and GnRH-II Peptide Derivatives on MCF-7 and HT-29 Cells, 9th International Symposium Solid Phase Synthesis, Norwich, 2007.
19. Kapuvári B., **Szabó I.**, Vincze B., Kovács M., Boldizsár M., Csuka O., Bősze Sz., Gaál D., Szabó R., Tóth G., Mező G. Tumor-szelektív GnRH analógok dimer származékainak szintézise és antitumor hatásának vizsgálata *in vitro* Magyar Onkológusok Társaságának XXVII. Jubileumi Kongresszusa, Budapest, 2007.
20. **Szabó I.:** GnRH dimer származékok *in vitro* és *in vivo* hatása. Kemotaxis Konferencia, Budapest, 2007.
21. **Szabó I.**, Bősze Sz., Orbán E., Kovács M., Vincze B., Csuka O., Gaál D., Hudecz F., Mező G.: GnRH-III dimer származékainak *in vitro* és *in vivo* hatása. A Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése, Balatonszemes, 2008. április
22. **Szabó I.**, Bősze Sz., Orbán E., Vincze B., Gaál D., Csuka O., Hudecz F., Mező G.: *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of symmetric GnRH-III derivatives. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnország, 2008. (2008. J. Pept. Sci. 14S, 117.)
23. Manea M., **Szabó I.**, Orbán E., Bősze Sz., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Csámpai, A., Radnai L., Mező G.: Development of GnRH-III antracycline conjugates as multifunctional drug delivery systems for targeted chemotherapy. 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finnország, 2008. (2008.J. Pept. Sci. 14S, 116.)
24. Manea M., **Szabó I.**, Tejeda M., Kapuvári B., Öhlschläger P., Reichard W., Gaál D., Mező G.: Synthesis and *in vivo* antitumor effect of an oxime bond linked daunorubicin-gonadotropin releasing hormone-III bioconjugate. 9th German peptide Symposium, Göttingen, Németország, 2009.
25. Mező G., Orbán E., **Szabó I.**, Hegedüs R., Manea M.: Synthesis and *in vitro* antitumor activity of antracycline-GnRH derivative conjugates. 9th German peptide Symposium, Göttingen, Németország, 2009.
26. Mező G., Orbán E., **Szabó I.**, Hegedüs R., Bősze Sz., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Manea M.: GnRH based drug delivery systemy for targeted chemptherapy, Biologically Active Peptides XI, Czech and Slovak National Conference, Csehország, Prága, 2009.